

BOMBAS DE PRÓTONS COMO MARCADORES BIOQUÍMICOS DE
RESPOSTAS ADAPTATIVAS AO ESTRESSE A BAIXAS
TEMPERATURAS

JANAÍNA APARECIDA HOTTZ RIMA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO DE 2015

BOMBAS DE PRÓTONS COMO MARCADORES BIOQUÍMICOS DE
RESPOSTAS ADAPTATIVAS AO ESTRESSE A BAIXAS
TEMPERATURAS

JANAÍNA APARECIDA HOTTZ RIMA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Produção vegetal”.

Orientador: Prof Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO DE 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 205/2015

Rima, Janaína Aparecida Hottz

Bombas de prótons como marcadores bioquímicos de respostas adaptativas ao estresse a baixas temperaturas / Janaína Aparecida Hottz Rima. – 2015.

83 f. : il.

Orientador: Arnaldo Rocha Façanha

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Caqui 3. Bombas de prótons 4. Bioenergética vegetal 5. Estresse I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 631.52

BOMBAS DE PRÓTONS COMO MARCADORES BIOQUÍMICOS DE
RESPOSTAS ADAPTATIVAS AO ESTRESSE A BAIXAS
TEMPERATURAS

JANAÍNA APARECIDA HOTTZ RIMA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Produção vegetal”.

Aprovada em 29 de maio de 2015.

Comissão Examinadora

Dra. Josimara Barcelos Venâncio (D.Sc. Produção Vegetal) – Sedu

Dr. Almy Junior Cordeiro de Carvalho (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF

Dra Marta Simone Mendonça Freitas (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF

Dr. Arnaldo Rocha Façanha (D. Sc. Química Biológica) - UENF
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda luz e benção durante minha trajetória.

Aos meus pais, Damasio e Glória, que sempre me incentivaram a estudar e por cederem o sítio para meus experimentos.

Aos meus pais de consideração, seu Cesi e Dona Lizete, que sempre me acolheram em momentos difíceis da minha vida.

À UENF e à FAPERJ pela concessão da bolsa e pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao meu orientador Arnoldo Rocha Façanha que me fez encantar pela ciência e me conduziu para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu namorado Luis Alfredo, mais conhecido como Scooby, pelo o amor, carinho e muita ajuda nos meus experimentos.

Ao Claudio Retamal (*in memorian*) por estar ao meu lado em momentos de descontração e também durante os momentos mais difíceis da minha vida e pelos ensinamentos em eletroforese.

Ao técnico Arthur, pelo auxílio no laboratório.

A todos os colegas de laboratório, Brunna, Raul, Gil, Antonio, Amanda, Josimara, Janielio, Julianna Santos, Savio, Fred, Juliana Couto e Inga, por contribuírem de alguma forma para a minha formação acadêmica e principalmente pela amizade.

À minha aluna de IC Livia Maria pela ajuda nos experimentos.

Ao Professor Carlos Logullo e aos seus alunos pela colaboração e discussões científicas.

Aos amigos Kamilla e Paulo Cesar, pela amizade e apoio.

Aos familiares e amigos que sempre estiveram torcendo por mim.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A cana-de-açúcar.....	3
2.2 A cultura do caquiheiro	4
2.3 Quebra da dormência das gemas e indução brotação do caquiheiro	4
2.4 Efeitos da baixa temperatura em plantas cultivadas.....	6
2.5 H ⁺ -ATPase.....	7
2.6 H ⁺ -PPase.....	9
REFERÊNCIAS	12
3. TRABALHOS.....	18
3.1 Hiper-acoplamento da H ⁺ PPase e o acúmulo de açúcares são induzidos durante o estresse causado por baixa temperatura em <i>saccharum officinarum</i>	18
RESUMO	18
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO.....	22
HIPÓTESE.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
Obtenção da fração microssomal.....	26

Determinação da concentração de proteínas	27
Atividade das H ⁺ -ATPases, V-ATPase e H ⁺ -PPase	27
Monitoramento do gradiente de prótons	28
Extração de açúcar total e determinação do teor de sacarose, glicose e frutose.....	28
Delineamento estatístico	29
RESULTADOS	30
Atividade de hidrólise das bombas de H ⁺	30
Gradiente de H ⁺	32
Acoplamento das bombas de H ⁺	34
Acúmulo de sacarose, glicose e frutose	35
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
3.2 EXTRATO FOLIAR DE <i>Manihot esculenta</i> Crantz. COMO PROMOTOR DE QUEBRA DE DORMÊNCIA E MODULADOR DA BROTAÇÃO DE GEMAS EM CAQUIZEIRO.....	47
RESUMO	47
INTRODUÇÃO	50
HIPOTESE.....	52
OBJETIVOS	53
Objetivo Geral.....	53
Objetivos específicos	53
MATERIAIS E MÉTODOS	54
Material vegetal	54
Preparo do extrato de mandioca.....	54
Avaliação da brotação das gemas dormentes em campo	54
Avaliação da brotação das gemas dormentes em casa de vegetação	55
Obtenção da fração microsomal	55
Determinação da concentração de proteínas	56
Atividade das H ⁺ -ATPases, V-ATPase e H ⁺ -PPase	56
Delineamento estatístico.....	57
RESULTADOS.....	58
Brotação das gemas dormentes em campo	58

Brotação das gemas dormentes em casa de vegetação	58
Atividade das P ⁺ -ATPases, V-ATPase e H ⁺ -PPase	62
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

RESUMO

RIMA, Janaína Aparecida Hottz, D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, maio de 2015. Bombas de prótons como marcadores bioquímicos de respostas adaptativas o estresse a baixas temperaturas. Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

Em nível celular, as baixas temperaturas afetam o crescimento das plantas, principalmente pelas alterações físico-químicas das membranas celulares, influenciando as proteínas de membrana e suas funções. As bombas de H^+ são transportadores de membrana que hidrolisam ATP ou PPi acoplado à geração de gradientes eletroquímicos que energizam sistemas de transporte transmembranares secundários, controlam pH extra e intracelular e participam na homeostase iônica. As H^+ -ATPases do tipo P estão localizadas na membrana plasmática e as do tipo V e H^+ -PPases no tonoplasto. Neste trabalho investigamos os efeitos de baixas temperaturas sobre as bombas de H^+ de cana-de-açúcar e o efeito de produtos que mimetizam o estresse causado por baixa temperatura em caqui. No primeiro caso, foram utilizados dois genótipos parentais de cana-de-açúcar, *S. officinarum* e *S. spontaneum* com três meses de idade, que permaneceram mantidos a 10°C ou em temperatura ambiente (casa de vegetação, controle), por 30 dias. No segundo caso, os experimentos foram realizados utilizando plantas de caqui da variedade Rama Forte, em estágio de dormência, na qual foram aplicados cianamida hidrogenada, Dormex e extrato

foliar de mandioca para promover a quebra de dormência. Como o estudo envolveu um representante das monocotiledôneas (cana-de-açúcar) e outro das dicotiledôneas (caqui) também foram analisadas comparativamente para aferir diferenças de susceptibilidade e respostas ao estresse por baixa temperatura, discriminantes duas grandes classes de angiospermas. O objetivo principal deste trabalho foi identificar marcadores moleculares do metabolismo energético efetivos em respostas adaptativas ao estresse a baixa temperatura e o entendimento dos mecanismos envolvidos durante o processo de quebra de dormência. Especificamente, foi testada a hipótese de que as bombas de prótons, enzimas-chave do metabolismo energético presentes nas biomembranas (P-ATPase, V-ATPase e H⁺-PPase), sejam marcadores bioquímicos efetivos na caracterização do nível de integridade celular em processos de adaptação da cana-de-açúcar à baixa temperatura e de indução de brotação de gemas dormentes do caquizeiro. Os resultados revelaram uma clara correlação entre a capacidade de acoplamento das bombas de H⁺ com a resistência ao estresse por baixas temperaturas, sugerindo que P-ATPases e a H⁺-PPase são potenciais alvos moleculares para programas de melhoramento de cana-de-açúcar que visem o desenvolvimento de canas adaptadas a regiões de clima subtropical e temperado. Os produtos utilizados em caquizeiro para promover a brotação das gemas dormentes, induziram a atividade da P-ATPase e a H⁺-PPase, indicando, assim, que estas enzimas também exercem um papel fundamental no processo de quebra de dormência.

ABSTRACT

RIMA, Janaína Aparecida Hottz, D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, maio de 2015. May 2015. pumps protons as biochemical markers of adaptive responses stress at low temperatures. Advisor: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

At the cellular level, low temperatures affect plant growth especially throughout physical and chemical changes in cell membranes, influencing their proteins and functions. The H⁺ pumps are membrane transporters that hydrolyze ATP or PPI coupled to the generation of electrochemical gradients that energize secondary transmembrane transport systems, control extra and intracellular pH and participate in ion homeostasis. A P-type H⁺-ATPase is located at the plasma membrane, while a V-type H⁺-ATPase and H⁺-PPases in the tonoplast. In this work, we investigated the effect of low temperatures on the sugarcane H⁺ pumps and products that mimic the cold stress in persimmon. In the first case, two parental genotypes of sugarcane were used, *S. officinarum* and *S. spontaneum*, grown for three months and treated at 10°C or at room temperature (at greenhouse, control) for 30 days. In the second study, the experiments were performed using persimmon plants of the variety Rama Forte in stage of dormancy, in which they were applied hydrogen cyanamide, Dormex[®] and cassava leaf extract to promote dormancy break. As the study involved a representative of the monocotyledons (sugarcane) and other of dicotyledonous

(khaki), these plants were also comparatively analyzed in order to reveal possible differential responses to cold stress, which could be distinctive for the two large classes of angiosperms. The ultimate aim of this study was to identify effective molecular markers of energy metabolism in adaptive responses to cold stress and shed further light on the understanding of the mechanisms involved during the dormancy breaking process. Specifically, we tested the hypothesis that the proton pumps, key enzymes of the energy metabolism present in biomembranes (P-ATPase V-ATPase and H⁺-PPase), are effective biochemical markers for the characterization of the cellular integrity level and adaptive processes in sugarcane at low temperature, as well as for the induction sprouting of dormant buds of persimmon. The results showed a clear correlation between the coupling capacity of some H⁺ pumps and the resistance to stress promoted by low temperature, suggesting that P-ATPases and H⁺-PPase are potential molecular targets for improvement of sugarcane programs aiming the development of hybrids and/or transgenics adapted to regions of subtropical and temperate climate. The products used in persimmon to promote sprouting of dormant buds induced the activity of the P-type H⁺-ATPase and the H⁺-PPase, indicating that these enzymes also play a key role in the dormancy breaking process.

1. INTRODUÇÃO

Estresses térmicos afetam o crescimento das plantas superiores, principalmente por induzir alterações físico-químicas (Ovar et al., 2000) e bioquímicas nas membranas celulares, incluindo significativas alterações nas proteínas membranares. A elucidação das dinâmicas de proteínas membranares em condições de estresses é de fundamental importância para o entendimento de rotas bioquímicas envolvidas nos processos adaptativos, e para a seleção de novos alvos moleculares para programas de melhoramento genético. Elucidar o que altera a atividade das proteínas de membrana e quais vias metabólicas estão envolvidas durante o processo de adaptação ao estresse pode ser a chave para o desenvolvimento de novas cultivares e novas formas de manejo.

Várias proteínas membranares podem interagir entre si unindo-se com lipídios para formar microdomínios especializados denominados *rafts*. Trabalhos recentes mostram que as P-ATPases podem formar complexos funcionais estruturados em *rafts* específicos (Ferreira et al., 2001). Estudos da dinâmica de lipídios característicos de *rafts* de plantas apresentam menor sensibilidade a choques térmicos em comparação com sistemas de *rafts* de mamíferos e fungos. Isso sugere que a estrutura do fitoesterol parece ser uma resposta evolutiva na adaptação das plantas a grandes variações de temperatura (Beck, et al., 2007). Todavia, ainda estão por serem exploradas as modulações integradas das expressões funcionais das principais bombas de H⁺ presentes nestes

microdomínios das membranas de células vegetais, em função de grandes variações térmicas.

Tais sistemas de transdução de energia desempenham papéis importantes nas células vegetais, em vários processos fisiológicos e nos mecanismos de tolerância a estresses, via geração de gradientes eletroquímicos de H^+ nas membranas biológicas (Serrano, 1989; Palmgren, 1998, 2001). As H^+ -PPases têm sido consideradas sistemas que em condições normais possuem uma expressividade funcional secundária em relação às H^+ -ATPases. Porém, em condições de estresse energético, como o induzido durante estresses por resfriamento (Zhang et al., 2011; Carystinos et al., 1995), anoxia (Carystinos, et al., 1995; Liu et al., 2010) e deficiência de nutrientes (Hernández-Domíguez et al., 2012), o gradiente eletroquímico gerado pelas H^+ -PPases passa a assumir um papel crucial na energização das biomembranas.

Todavia, trabalhos recentes indicam que as H^+ -PPases apresentam outras funções na célula além da acidificação do vacúolo, como, por exemplo, durante a germinação de plantas, a acidificação vacuolar parece não ser tão importante, mas a remoção do PPi citosólico pela H^+ -PPase é essencial para que ocorra a proliferação celular nesta fase (Ferjani et al., 2012). O mesmo fenômeno parece ser ativado em condições de estresse hídrico, onde foi detectado um desacoplamento total da H^+ -PPase vacuolar com manutenção apenas da atividade hidrolítica (Venancio et al., 2013).

Neste contexto, o estudo das modulações das atividades e expressão das bombas de prótons, presentes nas membranas plasmática e vacuolar, assume um caráter estratégico no entendimento e domínio dos processos celulares envolvidos na viabilidade de tecidos submetidos a baixa temperatura. A preservação da capacidade de regeneração e multiplicação do organismo completo, sem alterações indesejáveis depende, em primeira instância, da preservação da integridade das membranas celulares. O colapso do gradiente eletroquímico destas membranas sinaliza para diversos eventos de morte celular.

Assim, foi realizado um estudo integrado da modulação, em condições de baixa temperatura, das principais bombas de H^+ em duas espécies de cana-de-açúcar e no caqui, utilizando produtos que causam estresses semelhantes ao proporcionado pela baixa temperatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence ao reino Plantae, divisão: Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Poales, família: Poaceae e gênero *Saccharum* L. Há pelo menos seis espécies do gênero, sendo a cana-de-açúcar cultivada um híbrido multiespecífico, recebendo a designação *Saccharum spp.* (*S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule*) Matsuoka et al., 2005)

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes espécies cultivadas no Brasil, pois apresenta grande relevância econômica, social e ambiental, apresentando o país como o maior produtor mundial de açúcar e etanol de cana, com os menores custos de produção. A produtividade média brasileira é de 74 kg/ha (IBGE, 2015), mas ainda não é satisfatória, podendo serem alcançados índices melhores. Tal panorama reafirma a importância de se manter programas de melhoramento genético para obtenção de variedades mais produtivas, resistentes e estudos científicos de ponta para elucidação dos mecanismos adaptativos desta espécie.

O Brasil apresenta grande diversidade de clima e a temperatura exerce grande influência na produção de cana-de-açúcar. Em temperaturas abaixo de 20°C, o crescimento dos colmos é praticamente paralisado e o mesmo ocorre em temperaturas acima de 38°C, sendo que a faixa ótima de temperatura está entre

25 e 35°C, assim a produção de cana-de-açúcar é maior nas regiões mais quentes.

Em regiões frias, a temperatura pode chegar abaixo de 0°C. Dependendo da intensidade e do tempo de exposição ao frio, a cultura da cana poderá sofrer danos severos, pois temperaturas abaixo de 0°C formam cristais de gelo que são prejudiciais às membranas celulares, podendo causar rompimento das mesmas e morte das células (Santos, 2000). Contudo, alguns programas de melhoramento genético vêm desenvolvendo cultivares resistentes ao frio e os resultados mostraram que estas novas variedades, além de terem ótima produtividade, também acumulam mais açúcares, devido ao estresse causado pelo frio (Veríssimo et al., 2012).

2.2 A cultura do caquizeiro

O caquizeiro é classificado como pertencente ao reino plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Ericales, família Ebenaceae, gênero *Diospyros*, Espécie *Diospyros kaki*. Esta é uma frutífera de clima tipicamente subtropical que apresenta boa capacidade de adaptação às condições climáticas do país, é altamente produtiva e rústica, se adaptando a vários tipos de solos, sendo pouco exigente em tratos culturais (Mizobutisi et al., 2003).

Atualmente, é cultivado principalmente nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, basicamente na agricultura familiar. A participação do caqui na fruticultura brasileira ainda é pequena, sua produção e área cultivada representaram menos de 0,36% da produção e área total das frutas (IBGE, 2015). No estado do Rio de Janeiro, os municípios que apresentam maior produção são os seguintes: São José do Vale do Rio Preto com 50% da produção estadual, Sumidouro com 27% e Trajano de Moraes com 10% (IBGE, 2015)

2.3 Quebra da dormência das gemas e indução brotação do caquizeiro

O caquizeiro é uma planta que entra em dormência no período de inverno, e a quebra dessa dormência envolve fatores internos, como balanço dos promotores e inibidores de crescimento, ou externos, como fotoperíodo, radiação solar, temperatura, entre outros, sendo a temperatura um dos fatores mais importantes quando as plantas são cultivadas em regiões com insuficiência de frio hibernal (Marodin et al., 2002). Alguns produtos são utilizados para a quebra dessa dormência, como óleo mineral, cálcio cianamida (CaCN_2), nitrato de

potássio (KNO_3), paclobutrazol e cianamida hidrogenada (H_2CN_2) (Arellano, 1991; Mann et al., 1994), sendo o último o mais efetivo e mais utilizado nos sistemas produtivos (Mizobutisi et al., 2003).

A cianamida hidrogenada é rapidamente absorvida e metabolizada (Goldback et al., 1988), e causa diminuição da atividade da catalase, sem modificar a da peroxidase (Shulman et al., 1986), aumentando a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tecidos das gemas. Tem sido postulado que este aumento de H_2O_2 pode ser responsável pela ativação do ciclo das pentoses, culminando com a indução da quebra de dormência das gemas (Pérez et al., 2009). Foi também observado que a cianamida hidrogenada induz uma rápida mudança no conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), em gemas de pessegueiro (Siller-Cepeda et al., 1992; Or et al., 2000; Pérez et al., 2009). Uma diminuição da GSH foi observada dentro do período de 12 horas após a aplicação de cianamida hidrogenada, sugerindo que a GSH consumida nos tecidos pode ter sido utilizada na desintoxicação do H_2O_2 acumulado, quando a atividade da catalase foi inibida (Amberger, 1984). A aplicação de cianamida hidrogenada em gemas de videira resulta na redução da atividade da catalase, similar ao que ocorre em videiras mantidas à temperatura de 4 °C (Botelho, et al., 2002).

Foi descrito previamente que a cianamida hidrogenada não afetaria diretamente a respiração, mas poderia levar a distúrbios respiratórios via indução de estresse oxidativo pela inativação da catalase (Or et al., 2000). Em leveduras, a exposição a H_2O_2 leva à repressão de enzimas metabólicas envolvidas na glicólise e no Ciclo de Krebs logo após a exposição (Godon, 1998). Foi observado em plantas de uva que a aplicação de cianamida hidrogenada levou a indução simultânea e notável no nível de transcrição das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (Or et al., 2000), as quais, em condições normais, se expressam em baixos níveis nas células de plantas, mas são induzidas por distúrbios respiratórios (Perata e Alpi., 1993). Foi relatado um efeito direto da cianamida, inibindo parcialmente o consumo de O_2 mitocondrial, todavia, foi necessário expor as mitocôndrias a concentrações tão elevadas quanto 100 mM de cianamida, cerca de 100 vezes maior do que a concentração de azida (1 mM), para se verificar um bloqueio parcial da respiração mitocondrial (Pérez et al., 2009). Neste trabalho, nenhum dado conclusivo pode ser obtido das análises

feitas neste estudo sobre os efeitos da cianamida sobre a oxidase alternativa mitocondrial (AOX).

Por outro lado, a geração de espécies reativas de oxigênio, especialmente H_2O_2 , durante o estresse tem sido proposta como parte da cascata de sinalização que conduz à resposta da planta (Foyer et al., 1997; Anderson, 1998). Or et al., (2000) mostraram também que a expressão de uma *proteína quinase SNF-like* é induzida pela aplicação da cianamida hidrogenada. Esses autores sugerem que as proteínas quinases da família SNF-like podem funcionar como pseudoreceptores, e responder a diferentes tipos de estresse (Hardie, 1994). As proteínas quinases SNF1 e 4 de *Saccharomyces cerevisiae* são ativadas sob condições de privação de glicose e são necessárias para a desrepressão de genes envolvidos no catabolismo fermentativo de carboidratos (Celenza e Carlson, 1986; 1989), incluindo invertases intracelulares, insensíveis à depleção de sacarose (Carlson e Botstein, 1982). Em animais, essas quinases estão envolvidas na regulação do metabolismo do ácido graxo, sendo ativado por um aumento no nível de AMP, que ocorre em resposta a estresses energéticos (Carling et al., 1994; Hardie, 1994; Gao et al., 1995). Tem sido relatado que em plantas, algumas quinases SNF-like são reguladas por estresses que promovem depleção energética, como o que ocorre sob estresse hídrico e baixos níveis de ABA (Anderberg e Walker-Simmons, 1992), e privação de nutrientes (Sano e Youssefian, 1994).

2.4 Efeitos da baixa temperatura em plantas cultivadas

Temperaturas muito baixas ou baixas são responsáveis por perdas consideráveis na produtividade de plantas cultivadas. A maioria das plantas de clima temperado adquire tolerância ao estresse causado pelo frio por um processo chamado de "aclimatação ao frio", contudo isso não ocorre em plantas de clima tropical. As alterações na expressão de genes em resposta a temperaturas frias são seguidas por aumentos nos níveis de centenas de metabolitos, alguns dos quais são conhecidos por terem efeitos protetores contra os efeitos prejudiciais do estresse frio.

A exposição a baixa temperatura, entre 0 e 10°C, causa redução do crescimento da planta, reduz a taxa fotossintética em feijão (Siebeneichler et al., 1998), afeta a biossíntese, por exemplo, de clorofila (Hodgins e Van Huystee,

1986 a e 1986b) e fotossimilados (Pena-Valdivia et al., 1994). Assim, compreender o mecanismo de tolerância ao estresse frio e genes envolvidos na rede de sinalização do estresse pelo frio tem valor prático para a melhoria das colheitas (Rasool et al., 2014).

As membranas celulares são alvos primários a sofrerem injúrias causadas pela desidratação nos tecidos afetados por baixa temperatura (Steponkus, 1984). Essas injúrias podem ser indicadas por alterações na integridade estrutural e/ou na funcionalidade da membrana, induzidas pela desidratação (por exemplo, permeabilidade aumentada a íons, açúcares e proteínas) que ocorre após a reidratação (Prásil e Zámečník, 1998), perdendo, assim, a propriedade da permeabilidade seletiva.

Quando o frio é excessivo e chega ao ponto de congelamento, a injúria se deve principalmente à desidratação excessiva ou à formação de gelo dentro das células, ocorrendo o rompimento das membranas, concentração de solutos no citoplasma a níveis tóxicos e desnaturação de ácidos nucleicos (Santos, 2000), levando à morte celular (Sakai e Larcher, 1987).

A membrana plasmática tem um papel central no comportamento celular em momentos de estresse causado por baixa temperatura (Santos 2000), pois é a interface entre o meio extracelular e o citoplasma controlando o efluxo/influxo de água (Uemura e Steponkus, 1994). A estabilidade da membrana plasmática durante o processo de adaptação ao frio depende de vários fatores, tais como, o aumento da quantidade de crioprotetores endógenos (e.g. açúcares), síntese de determinadas proteínas e alteração na composição lipídica da membrana plasmática (Uemura e Steponkus, 1994).

2.5 H⁺-ATPase

As H⁺-ATPase são largamente distribuídas em animais, vegetais, algas, fungos e também ocorrem em procariontes. Estão localizadas na membrana plasmática, onde bombeiam H⁺ do citoplasma para o exterior da célula (Serrano, 1989). São enzimas transmembranares capazes de hidrolisar ATP, gerando um gradiente de potencial eletroquímico de H⁺, que energiza transportes secundários de nutrientes e outros importantes metabólitos (Taiz, 2009). As ATPases classificadas como do tipo P, são encontradas na membrana plasmática (H⁺-ATPases e Ca²⁺-ATPases), enquanto que as do tipo V (V-H⁺-ATPases ou

simplesmente V-ATPases) estão presentes no tonoplasto e em diversas endomembranas de diferentes organelas (Taiz, 2009).

A Figura 1 apresenta o modelo estrutural da H⁺-ATPase (Pedersen et al., 2007).

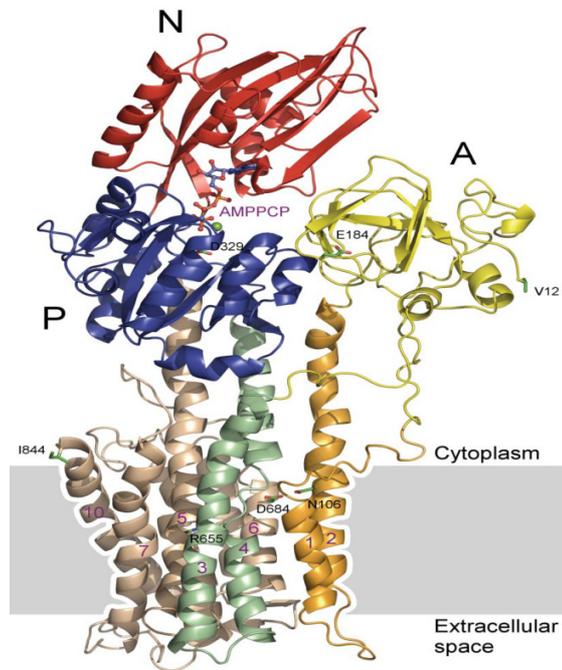


Figura 1: Modelo estrutural da H⁺-ATPase da membrana plasmática (Adaptado de Pedersen et al., 2007).

Em plantas, essas enzimas apresentam funções essenciais para o crescimento vegetal que envolve a “teoria do crescimento ácido”. Para que aconteça o crescimento ácido é necessário que ocorra o aumento da concentração de H⁺ que é realizado pela H⁺-ATPase, ativando outras enzimas (por exemplo, as expansinas), fazendo com que a parede celular se torne mais extensível pelo relaxamento da tensão, permitindo que a célula absorva mais água e se amplie (Rayle e Cleland, 1992).

Na Figura 2 é mostrada a H⁺-ATPase vacuolar que acidifica o lúmen do vacúolo (Rea e Poole, 1993), sendo modulada de diferentes maneiras quando a planta está sob estresse. No caso do estresse por resfriamento, esta bomba protônica sofre um desacoplamento estrutural com concomitante inibição de suas funções (Wright et al., 1982; Adachi et al., 1990; Matsura-Endo et al., 1992; Kasamo et al., 2000), as quais passam a ser supridas pela atividade de uma outra

classe de bombas de H^+ , as $V\text{-}H^+\text{-PPases}$. O processo de inativação das $V\text{-}ATPases$ pelo estresse por resfriamento foi descrito como envolvendo três etapas: desprendimento das subunidades da parte periférica da ATPase, inativação da enzima e a degradação parcial do tonoplasto (Matsura-Endo et al., 1992). Kasamo et al., (2000) sugerem ainda, que a redução da atividade da $H^+\text{-}ATPase$ vacuolar causado pelo frio é devido à diminuição na fluidez na superfície da bicamada lipídica do tonoplasto, causado pelas mudanças nos glicolípídeos.

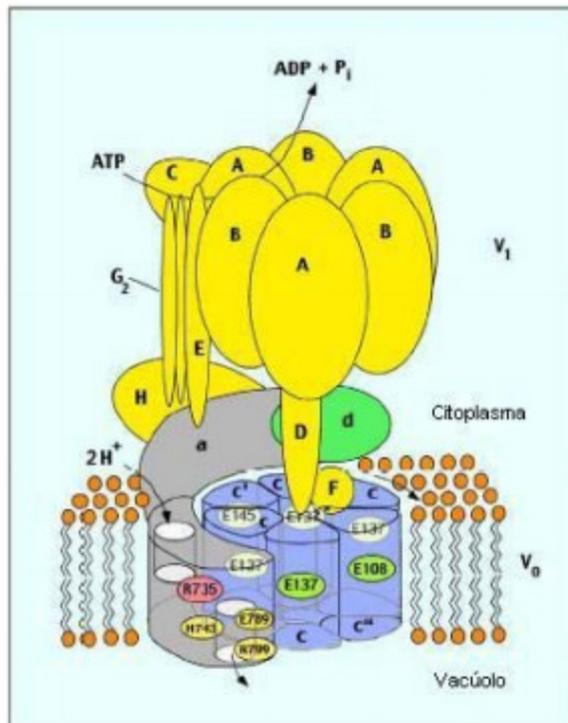


Figura 2: Modelo estrutural da $V\text{-}ATPase$ da membrana vacuolar. A $V\text{-}ATPase$ hidrolisa o ATP no domínio V_1 causando um movimento de rotação no eixo central da enzima (subunidades D e F), ocorrendo também a rotação das subunidades localizadas no domínio V_0 , finalizando com o transporte de H^+ para o interior do vacúolo (Adaptado de Kawasaki-Nish et al., 2003).

2.6 $H^+\text{-}PPase$

As pirofosfatases se enquadram em duas principais classes, a primeira designando enzimas solúveis que se encontram livre no citoplasma, e a segunda, relacionada a enzimas transportadoras ligadas às membranas, denominadas $H^+\text{-}PPase$ (Baykov et al., 1990). A $V\text{-}PPase$ ($H^+\text{-}Pirofosfatase$) é uma enzima que está localizada na membrana vacuolar das células de algumas algas, protozoários, bactérias, arqueobactérias e em todas as plantas (Drozdowicz e

Rea, 2001). Essa enzima bombeia prótons do citosol para o vacúolo usando pirofosfato inorgânico (PPi) complexado a íons de magnésio como substrato, gerando um potencial eletroquímico usado para energizar os transportadores secundários (Rea et al.,1992).

A Figura 3 representa o modelo estrutural da H⁺-PPase (Maeshima, 2000).

Em condições de estresses energéticos as concentrações de PPi permanecem estáveis na célula, enquanto o nível de ATP decresce (Weiner et al., 1987), afetando todo o metabolismo energético, inclusive causando a inibição das H⁺-ATPases que dependem da hidrólise de ATP para a translocação de H⁺. Este cenário se estabelece sob condições de temperaturas muito baixas, quando a V-PPase assume a função de manter o gradiente de H⁺ através da membrana vacuolar, energizando os transportadores secundários e combatendo a acidose citoplasmática (Darley et al., 1995), consistindo num elemento importante na estratégia de sobrevivência de plantas sob tais condições (Carystinos et al., 1995).

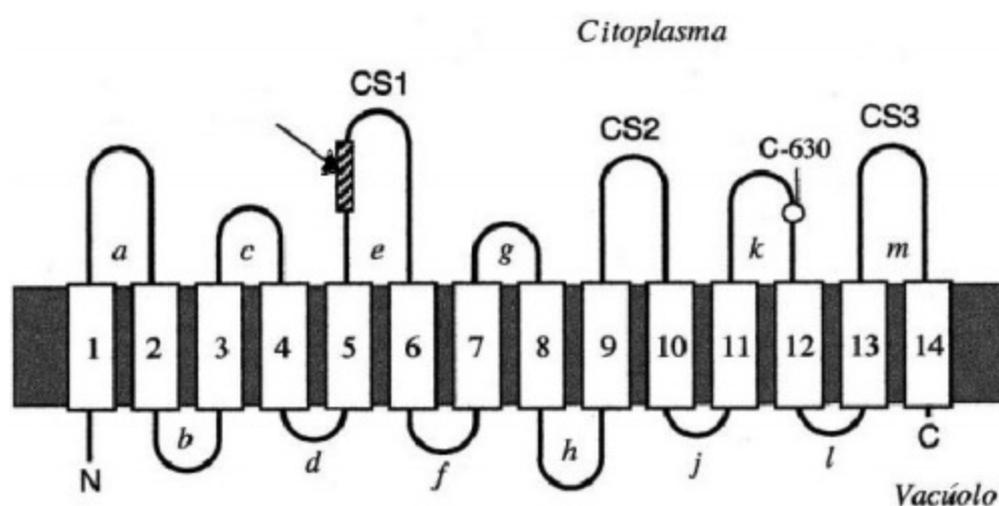


Figura 3: Modelo estrutural da H⁺-PPase, composto por 14 domínios transmembranares. O sítio de ligação do PPi é indicado pela seta. Adaptado de Maeshima, (2000).

Exposição a baixas temperaturas gera estresse energético (Stewart e Guinn, 1969) devido à disfunção mitocondrial (Lyons e Raison, 1970). Experimentos realizados com arroz sob temperatura de 10°C induziu aumento

progressivo da expressão da V-PPase em até 20 vezes, após 6 dias de tratamento. Vinte e quatro horas após o retorno das plantas, à temperatura de 25°C, a expressão desta enzima diminuiu sensivelmente, mas mantendo-se, ainda, acima dos níveis de expressão do controle (Carystinos et al., 1995). Baseado nesses dados foi sugerido que a V-PPase seria um elemento importante nas estratégias de sobrevivência das plantas sob estresses causados por baixa temperatura (Carystinos et al., 1995). Por outro lado, os mesmos autores verificaram uma inibição da atividade hidrolítica da enzima, tanto em plantas expostas ao tratamento de 10°C, quanto em condições de anoxia. Confirmando esses dados, Darley et al., (1995), mostraram que a expressão da V-PPase aumentou cerca de 1,5 vezes quando cultivados a 4°C num período de apenas 12 horas, mas a atividade hidrolítica da enzima foi sensivelmente inibida.

Zhang et al., (2011) verificaram que arroz transgênicos com superexpressão do gene *OVP1* que codifica uma V-PPase, aumenta a tolerância ao estresse causado por baixa temperatura (4°C), e essa tolerância estaria relacionada com acúmulo de osmólito (por exemplo, prolina) e aumento da integridade da membrana. Outros trabalhos vêm relatando a importância das V-PPase na tolerância de estresses abióticos como, por exemplo, salinidade (Fukuda et al., 2004;), anoxia (Liu et al., 2010), estresse hídrico (Venancio et al., 2013; Park et al., 2005) e plantas com deficiência de nutrientes (Kasai et al., 1998; Hernández-Domíguez et al., 2012).

REFERÊNCIAS

Adachi P, Puopolo K, Marquez-Sterling N, Arai H, Forgac M (1990) Dissociation, cross-linking, and glycosylation of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem* 265: 967-973.

Amberger, A. (1984) Uptake and metabolism of hydrogen cyanamide in plants. In: R.J. Weaver (Ed.) *Proceeding of Bud Dormancy of Grapevine: Potential and Practical Uses of Hydrogen Cyanamide on Grapevine*, 20 August 1984, University of California, Davis, CA, pp. 5–10.

Anderberg, R.J.; Walker-Simmons, M.K. (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Plant Biology*, Vol. 89, pp. 10183-10187.

Anderson, M. D.; Chen, Z.; Klessig, D. F. (1998) Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of pr-1 gene expression *Phytochemistry*, Vol. 47~ No. 4, pp. 555-566.

Botelho, R. V., Pires, E. J. P., Terra, M. M. (2002) Brotação e produtividade de videiras da cultivar centennial seedless (*Vitis vinifera* L.) tratadas com cianamida hidrogenada na região noroeste do estado de São Paulo. *Revista Brasileira Fruticultura, Jaboticabal - SP*, v. 24, n. 3, p. 611-614.

Beck, J. G., Mathieu, D., Loudet C., Buchoux, S., Dufourc, E. J. (2007) Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB Journal*. 21, 1714–1723.

Carling, D.; Aguan, K.; Woods, A.; Verhoevens, A.J.M.; Berim, R.K.; Brennan, C.H.; Sidebottom, C.; Davison, M.D.; Scott, J. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinases homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 15, pp. 11442-11448.

Carlson, M.; Botstein, D. (1982) Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast Invertase. *Cell*, Vol. 28, 145-154.

Carystinos, C.D.; MacDonald, H.R.; Monroy, A.F.; Dhindsa, R. S.; Poole, Ronald J. (1995) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiology*. 108: 641-649.

Celenza, J.L.; Carlson, M. (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*. 12;233(4769):1175-80.

Celenza, J.L.; Carlson, M. (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Molecular and Cellular Biology*, p. 5034-5044 Vol. 9, No. 11.

Darley, C. P.; Davies, J. M.; Sanders D. (1995) Chill-Induced Changes in the Activity and Abundance of the Vacuolar Proton-Pumping Pyrophosphatase from Mung Bean Hypocotyls'. *Plant Physiology* 109: 659-665.

Drozdowicz Y.M., Rea PA (2001) Vacuolar H⁺ pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends Plant Sci* 6:206–211.

Ferjani A, Segami S, Horiguchi G, Sakata A, Maeshima M, Tsukaya H. (2012) Regulation of pyrophosphate levels by H⁺-PPase is central for proper resumption of early plant development. *Plant Signaling & Behavior*. 7(1):38-42.

Foyer, C.H., Lopes-Delgado, H., Dat, J.F. and Scott, I.M. (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant*. 100: 1554–1561.

Gao, G.; Widmer, J.; Stapleton, D.; The, T.; Cox, T.; Kemp, B. E.; Witters, L. A. (1995) Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochimica et Biophysica Acta* 1266, 73-82.

Gaxiola, R.A.; Palmgren, M.G.; Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett* 581: 2204-2214.

Godon, C.; Lagniel, G.; Lee, J.; Buhler, J.M.; Kieffer, S.; Perrot, M.; Boucherie, H.; Toledano, M.B.; Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 28;273(35):22480-9.

Goldback, H., Thaler, C., Wünsch, A. (1988) Decomposition of ¹⁴C-labelled cyanamide in *Vitis vinifera* cuttings. *Journal of Plant Physiology*, v.133, p.299-303.

Hardie, D.G. (1994) Ways of coping with stress. *Nature* 370, 599-600.

Hernández-Domínguez, E. E.; Valencia-Turcotte, L. G.; Rodríguez-Sotres; R. (2012). Changes in expression of soluble inorganic pyrophosphatases of *Phaseolus vulgaris* under phosphate starvation. *Plant Science*, v187 pag 39– 48.

Hodgins, R., Van Huystee, R.B. Delta-aminolevulinic acid Metabolism in chill stressed maize (*zea mays* l.) *Journal plant Physiology*, 126: 257-268, 1986b.

Hodgins, R., Van Huystee, R.B. Porphyrin metabolism in chill Stressed maize (*zea mays* l.). *Journal plant physiology*, 126:257-268, 1986a.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

Kasamo, K.; Yamaguchi, M.; Nakamura, Y. (2000) Mechanism of the Chilling-Induced Decrease in Proton Pumping across the Tonoplast of Rice Cells. *Plant & cell Physiology*. 41(7): 840-849.

Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., Forgac, M. (2003) Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS* 545:76-85.

Liu, Q.; Zhang, Q.; Burton, R. A.; Shirley, N.J.; Atwell, B.J. (2010) Expression of vacuolar H⁺-pyrophosphatase (OVP3) is under control of an anoxia-inducible promoter in rice. *Plant Molecular Biology*. 72:47–600.

Lyons J.M., Raison J.K. (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiology* 45 386-389.

Maeshima, M. (2000) Vacuolar H-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 37-51.

Matsuoka, S.; Garcia, A. A. F.; Arizono, H. Melhoria da cana-de-açúcar. *In*: Borém, A. Melhoria de espécies cultivadas. Viçosa : Editora UFV, p.205-251, 2005.

Matsura-Endo, C.; Maeshima, M.; Yoshida, S. (1992) Mechanism of the Decline in Vacuolar H⁺-ATPase Activity in Mung Bean Hypocotyls during Chilling. *Plant Physiol.* 100, 718-722.

Marodin, G.A.B.; Sartori, I.A.; Guerra, D.S. (2002) Efeito da aplicação de cianamida hidrogenada e óleo mineral na quebra de dormência e produção do pessegueiro – ‘Flamecrest’. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal* – SP, v. 24, n. 2, p. 426-430.

Mizobutisi, G.P.; Bruckner, C. H.; Salomão, L.C.C.; Ribeiro, R.A.; Motta, W.F. (2003) Efeito da aplicação de cianamida hidrogenada e de óleo mineral em caquizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal* – SP, v. 25, nº 1, p. 89-92.

Or, E.; Vilozy, I.; Eyal, Y.; Ogrudovitch, A. (2000). The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Molecular Biology* 43: 483–494.

Ovar, B.L.; Sangwan, V.; Omann, F.; Dhindsa, R.S. (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23, 785–794.

Palmgren M.G (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, pp. 817–845.

Palmgren M.G. (1998) Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Adv Botanical Res*, 28 pp. 1–69.

Park S, Li J, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang H, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA (2005) Up-regulation of H⁺-pyrophosphatase (H⁺-Ppase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Pedersen, B. P.; Buch-Pedersen, M. J.; Morth, J. P.; Palmgren, M. G.; Nissen, P. (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450 (7172): 1111-1114.

Perata, P.; Alpi, A. (1993) Plant responses to anaerobiosis. *Plant Science* 93, 1- 17.

Pérez, F. J. Vergara, R.; Or, E. (2009) On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regul*, 59:145–152.

Peña-Valdivia, C.B., Lagunes E., L. Del C. & Perales R., H.R. Chilling effects on leaf photosynthesis and seed yields of *Phaseolus vulgaris*. *Canadian journal of botany*, 72: 1403-1411, 1994.

Rasool, S., Singh, S., Hasanuzzaman, M., Muneebu. R. (2014) Plant resistance under cold stress: metabolomics, proteomics, and genomic approaches. *In: Emerging technologies and management of crop stress tolerance, Biological Techniques*. V 1, pages 79-98.

Prásil, I. and Zámecnik, J. (1998) The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environmental and Experimental Botany*, 40: 1-10.

Rayle, D. L. Cleand, R (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271-1274.

Rea, P.A; Kim Y, Sarafian V, Poole R, Davies J, Sanders D (1992) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase: a new category of ion translocase. *TIBS* 17:348–352.

Rea, P.A., Poole, R.J. (1993) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 157-180.

Sakai, A. and Larcher, W. (1987) Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. Berlin, Heidelberg, *Springer-Verlag*.

Sano, H.; Youssefian, S. (1994) Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins. *Plant Biology*, vol. 91, pp. 2582-2586.

Santos, I.R.I. 2000 Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 70-84.

Siebeneichle, S. C., R., Sant'Anna, Martinez, C. A., Mosquim, P. R. Cambraia, J. (1998) Alterações na fotossíntese, condutância estomática e

eficiência fotoquímica induzida por baixa temperatura em feijoeiros. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v.10 n.1, p.37 – 44.

Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 40 pp. 61–94.

Steponkus, P.L. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 543-584.

Stewart JM, Guinn G (1969) Chilling injury and changes in adenosine triphosphate of cotton seedlings. *Plant Physiol* 44 605-608.

Taiz, L. e Zeiger, E. (2009) *Fisiologia Vegetal*, 4^{ed} – Porto Alegre, Artmet.

Uemura, M. e Steponkus, P.L. (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiology*, 104: 479-496.

Venancio, J. B., Catunda, M. G. Ogliari, J. Rima, J. A. H., Okorokova-Façanha, A. L., Façanha, A.R. (2013) A Vacuolar H(+)-Pyrophosphatase Differential Activation and Energy Coupling Integrate the Responses of Weeds and Crops to Drought Stress. *Biochimica et Biophysica Acta*.

Verissimo, M. A. A.; Silva, S. D. A.; Aires, R. F.; Daros, E.; e Panziera, W. (2012) Adaptabilidade e estabilidade de genótipos precoces de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.47, n.4, p.561-568.

Weiner H, Stitt M, Heldt HW (1987) Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline phosphatase in leaves. *Biochim Biophys Acta* 893: 13-21.

Wright, L. C.; McMurchie, E. J.; Pomeroy, M. K.; Raison, J. K. (1982) Thermal Behavior and Lipid Composition of Cauliflower Plasma Membranes in Relation to ATPase Activity and Chilling Sensitivity. *Plant Physiol.* 69, 1356-1360.

Zhang, J.; Li, J.; Wang, X.; Chen, J. (2011) OVP1, a Vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance *Plant Physiology and Biochemistry* 49 33-38.

3. TRABALHOS

3.1 Hiper-acoplamento da H⁺PPase e o acúmulo de açúcares são induzidos durante o estresse causado por baixa temperatura em *saccharum officinarum*

RESUMO

Em nível celular, as baixas temperaturas afetam o crescimento das plantas, principalmente pelas alterações físico-químicas das membranas celulares, influenciando as proteínas de membrana e suas funções. As H⁺-ATPases das membranas plasmática e vacuolar e a H⁺-PPases de tonoplasto energizam sistemas de transporte secundário, controlaram pH celular e participam na homeostase iônica, sendo moduladas em resposta a estresses ambientais. Neste trabalho investigamos os efeitos de baixas temperaturas sobre as bombas de H⁺ de cana-de-açúcar. Foram utilizados dois genótipos parentais, *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*, cultivados em casa de vegetação a temperatura ambiente. Com dois meses de idade, um grupo de plantas permaneceu em casa de vegetação (controle) e outro grupo foi transferido para BOD com a temperatura de 10°C por 30 dias. Foram isoladas dos caules vesículas microssomais por centrifugação diferencial, em seguida foram mensuradas a atividade hidrolítica e o transporte de H⁺, colorimetricamente e fluorimetricamente, respectivamente. Também foram avaliadas as alterações de frutose, glicose e sacarose. *S. officinarum* cultivada a 10°C acumulou mais frutose e sacarose e suas bombas do tipo P e V mostraram-se desacopladas

durante o ensaio *in vitro* a 10°C, enquanto a H⁺-PPase mostrou-se hiperacoplada nos ensaios *in vitro* a 10°C. *S. spontaneum* cultivada a 10°C reduziu os teores de sacarose, mas os níveis de glicose e frutose permanecem inalterados. Suas bombas do tipo P permanecem acopladas mesmo nos ensaios *in vitro* a 10°C. Os resultados sugerem uma clara correlação entre a capacidade de acoplamento das bombas de H⁺ com a resistência ao estresse por baixas temperaturas. Os resultados indicam que a P-ATPase e a H⁺-PPase são potenciais alvos moleculares para programas de melhoramento que visem o desenvolvimento de canas adaptadas às regiões de clima subtropical e temperado.

Palavras chaves: Cana-de-açúcar, bombas de prótons, bioenergética.

H⁺-PPase hyper-coupling and sugar accumulation are induced during stress caused by low temperature in *Saccharum officinarum*

ABSTRACT

At the cellular level, low temperatures affect the plant growth, especially by physical and chemical changes of cell membranes, influence the membrane proteins and their functions. The H⁺-ATPase in plasma and vacuolar membranes and the H⁺-PPases in the tonoplast energize secondary transport systems, control cell pH and participate in ion homeostasis, being modulated in response to environmental stresses. In this study, we investigated the effect of low temperatures on the sugarcane H⁺ pumps. Two parental genotypes were used, *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*, grown in the greenhouse at room temperature. With two months old, one group of plants remained in a greenhouse (control) and another group was transferred to BOD chamber at the temperature of 10°C for 30 days. Microsomal vesicles were isolated by differential centrifugation of the stem, and hydrolytic activity and H⁺ transport was measured colorimetric and fluorimetrically, respectively. We also assessed the fructose, glucose and sucrose changes. *S. officinarum* grown at 10°C accumulated more fructose and sucrose and their P and V type pumps proved to be uncoupled during *in vitro* assays at 10°C, while the H⁺-PPase proved hypercoupled in the *in vitro* assays at 10°C. While *S. spontaneum* grown at 10°C reduced the sucrose content, but the glucose and fructose levels remain unchanged. Their P-type pumps remain coupled even *in vitro* assays at 10°C. The results suggest a clear correlation between the H⁺ pumps coupling capacity with resistance to stress by low temperature. The results indicate that the P-ATPase and H⁺-PPase are potential

molecular targets for breeding programs for the development of rods adapted to regions of subtropical and temperate climate.

Key words: Sugar cane, proton pumps, bioenergetic

INTRODUÇÃO

Atualmente, a grande procura por energia renovável coloca a cana-de-açúcar produzida no Brasil num cenário favorável, pois o país apresenta boas condições climáticas, tornando menores os custos de produção. Assim o Brasil se tornou o maior produtor mundial de açúcar e etanol de cana.

O Brasil é um país que tem grande diversidade de clima e a temperatura exerce grande influência na produção de cana-de-açúcar. Estresses térmicos afetam o crescimento das plantas, principalmente pelas alterações físico-químicas das membranas celulares que as tornam mais rígidas e menos fluidas, ocorrendo também alterações nas proteínas membranares (Ovar et al., 2000).

As proteínas são importantes alvos de estudos desde o entendimento de rotas bioquímicas até como alvos de melhoramento genético. Elucidar como proteínas são alteradas durante a adaptação ao estresse causado por baixa temperatura pode ser a chave para o desenvolvimento de novas cultivares e novas formas de manejo e/ou condução da cultura de cana-de-açúcar.

A maioria dos processos biológicos é controlada por proteínas, atuando de diversas formas como, por exemplo, agem como enzimas, hormônios, anticorpos, componentes de estrutura e receptores celulares (Aebersold e Mann, 2003; De Souza et al., 2003). As proteínas localizadas nas membranas celulares como as P-ATPases podem formar complexos juntamente com as *rafts* (Ferreira et al., 2001), tornando as plantas mais resistentes aos choques térmicos em comparação com sistemas de *rafts* de mamíferos e fungos. Isso sugere que a

estrutura do fitoesterol parece ser uma resposta evolutiva na adaptação das plantas a grandes variações de temperatura (Beck et al., 2007).

O estudo das modulações das atividades das bombas de prótons, presentes nas membranas plasmáticas e vacuolares, assume um caráter estratégico no entendimento e domínio dos processos celulares envolvidos na viabilidade de tecidos submetidos ao estresse térmico. O colapso do gradiente eletroquímico destas membranas sinaliza para diversos eventos de morte celular.

HIPÓTESE

Considerando trabalhos prévios que relacionaram o aumento da expressão da H⁺-PPase com a tolerância ao estresse por baixas temperaturas em diferentes espécies vegetais, postula-se que esta enzima possa ter um papel central no processo de adaptação à baixa temperatura. A hipótese a ser trabalhada propõe que o tratamento com baixas temperaturas pode induzir alterações na atividade da H⁺-PPase, fundamentais para o processo aclimatação ao frio.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi relacionar a atividade da H⁺-PPase com a tolerância ao estresse por baixas temperaturas e acúmulo de açúcares no colmo. Para tanto, foram utilizadas duas espécies parentais de cana-de-açúcar, *S. spontaneum*, que tem baixo acúmulo de sacarose, alto conteúdo de fibras e resistência a estresses ambientais, e a *S. officinarum*, que apresenta alto acúmulo de sacarose e pouca resistência a estresses.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois parentais de cana-de-açúcar, *S. spontaneum* e *S. officinarum*. Os experimentos foram conduzidos em duas etapas, na primeira as plantas foram cultivadas em casa de vegetação, temperatura ambiente e com 2 meses de idade. Na segunda parte, um grupo de plantas permaneceu na casa de vegetação e outro grupo foi transferido para BOD com temperatura de 10°C, permanecendo durante 30 dias. Após esse período foi realizado o isolamento das vesículas dos colmos que continham as bombas de H⁺ e realizados os ensaios de atividade enzimática específica e gradiente de H⁺ em duas temperaturas distintas, 25°C e 10°C. Assim os tratamentos foram os seguintes: cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 25°C (25/25, controle); cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 10°C (25/10); cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 25°C (10/25) e; cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 10°C (10/10).

Obtenção da fração microssomal

A fração microssomal foi obtida do colmo da cana de açúcar submetida a 10°C e controle permaneceu na casa de vegetação durante 30 dias. Essa fração foi obtida a partir da centrifugação diferencial (De Michelis e Spanswich, 1986). O material foi cortado, pesado e triturado, em seguida, homogeneizado em meio tamponado. O tampão de extração foi composto de HEPES-KOH 50 mM (pH 7,5), sacarose 250 mM, KCl 150 mM, EDTA 150 mM, DTT 1 mM, PVPP 0,8 %, BSA 0,2%, PMSF 1 mM, na relação massa de tecido: volume de tampão de 1:2. A manipulação das soluções foi realizada em temperatura entre 0 e 4°C. O pH foi

mantido entre 7,6 e 8,0. O homogenato resultante foi filtrado utilizando-se miracloth e submetido a centrifugação (3.000 x g, 15 min.), o precipitado foi descartado para a remoção de células não rompidas e núcleos. Para o isolamento das mitocôndrias, o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g, 15 min. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação (100.000 x g, 60 min.). O precipitado dessa centrifugação foi solubilizado em solução tampão contendo: HEPES-KOH 25 mM, sacarose 250mM, EDTA 0,1 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM.

Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As amostras foram ensaiadas em duplicata, com as concentrações de BSA variando de 0 a 20 µg, com intervalos de 2 µg. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 595 nm de comprimento de onda.

Atividade das H⁺-ATPases, V-ATPase e H⁺-PPase

A atividade das bombas foi determinada colorimetricamente conforme descrito por Fiske e Subbarow (1925), medindo-se a quantidade de fosfato inorgânico liberado pela reação. A reação foi iniciada com a adição da proteína, e parada pela adição de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10% (v/v). Composição do meio reacional: MOPS-KOH pH 6,5 ou 7,0, 50 mmol L⁻¹; MgCl₂ 3 a 5 mmol L⁻¹, KCl 100 mmol L⁻¹, ATP 1 mmol L⁻¹ e 50 µg de proteína. A hidrólise de ATP representa a atividade sensível a 0,2 mmol L⁻¹ de vanadato, ou sensível a 5 nmol L⁻¹ concanamicina A, e para hidrólise de PPi representada a atividade sensível a KCl 100 mmol L⁻¹. A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2% + Ácido Ascórbico 1% (100:1) e, após 15 minutos, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nessa reação, o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 25 °C ou 10°C, com ou sem vanadato, com ou sem concanamicina A ou com ou sem KCl e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase/PPase.

Monitoramento do gradiente de prótons

O gradiente de prótons foi medido como descrito por Michelis e Spanswick (1986), com algumas modificações propostas por Façanha e De Méis (1998), monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência (F/min) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro. O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, e assumindo-se que quando não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Então a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio reacional foi composto de 10 mM de Tris pH 6.5 ou 7,0, KCl 100 mM, ACMA 1,3 μ M, MgSO₄ 1 ou 3 mM e ATP 10 mM ou PPI 0,4mM e 50 μ g de proteína. O gradiente foi dissipado com NH₄Cl 1,5 mM.

Extração de açúcar total e determinação do teor de sacarose, glicose e frutose

Para a extração de açúcares solúveis, macerou-se cerca de 0,1g de colmo de plantas de cana-de-açúcar, com nitrogênio líquido e na presença de PVPP 10% p/v e 50 mM ácido ascórbico. Após obtenção de um pó fino, acrescentou-se 1 mL de etanol 80%. Levaram-se os tubos ao banho-maria a 70°C por 90 minutos. Decorrido esse tempo, centrifugaram-se os tubos a 13000 rpm por 10 minutos a 40°C. Coletou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 1 mL de etanol 80%, centrifugando-se novamente a 13.000 rpm por 10 minutos a 40°C. Coletou-se o sobrenadante e juntou-o com o outro da centrifugação anterior, que foram congelados para posterior dosagem dos açúcares redutores e solúveis (Stitt et al., 1989).

A determinação de glicose, frutose e sacarose foi realizada por análise enzimática espectrofotométrica (Stitt et al. 1989) em função da redução do NAD⁺ a 340 nm. Adicionaram-se, aos poços da placa, a amostra, água e tampão contendo: 100 mM de imidazole pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 2 mM NAD e 1 mM ATP. Para a quantificação da glicose, adicionaram-se 2U de G6PDH e 1,5U hexoquinase. Encerrada a reação, adicionaram-se, aos poços, 3U de fosfoglicose

isomerase, para quantificação da frutose. Por fim, para determinação da sacarose, adicionaram-se 5U de β -fructosidase.

Delineamento estatístico

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, com os seguintes tratamentos: cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 25°C (25/25, controle); cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 10°C (25/10); cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 25°C (10/25) e; cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 10°C (10/10).

RESULTADOS

Atividade de hidrólise das bombas de H⁺

A atividade específica da P-ATPase indica que a bomba tem modulação pela temperatura em ambos os parentais (Figuras 1A e 1B). Observa-se que na *S. officinarum*, nos tratamentos 25/10 e 10/10, a atividade enzimática é reduzida, no entanto, não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos 25/25 e 10/25 (Figura 1A). A atividade da P-ATPase do parental *S. spontaneum* reduz cerca de 4,5 vezes no tratamento 25/10 quando comparado com o controle (25/25), contudo, no tratamento 10/25 houve o estímulo da atividade, aproximadamente 2 vezes com relação ao controle, já no tratamento 10/10 a atividade de hidrólise ficou igual ao controle (Figura 1B).

A atividade específica da V-ATPase da *S. officinarum*, foi maior nos tratamentos 25/10 e 10/25 em relação ao controle, sendo que no tratamento 25/10 houve aumento de 1,8 vezes quando comparado com o controle, já no tratamento 10/25, o estímulo da enzima foi de 1,3 vezes, entretanto, no tratamento 10/10 não houve diferença em relação ao controle (Figura 1C). A atividade da enzima da *S. spontaneum* aumentou em todos os tratamentos em relação ao controle (Figura 1D), nos tratamentos 25/10 e 10/25, o estímulo foi aproximadamente de 2,5 vezes, enquanto no tratamento 10/10, o aumento foi de 3,3 vezes em relação ao controle (25/25) (Figura 1D)

Foi observada a inibição da hidrólise de PPi da H⁺-PPase no parental *S. officinarum*, a redução foi de cerca de 2 vezes para os tratamentos 25/10 e 10/25,

enquanto no tratamento 10/10, a redução foi 5,7 vezes (Figura 1E). A *S. spontaneum* apresentou estímulo da atividade nos tratamentos 10/25 e 10/10 (Figura 1C). Quando as plantas são submetidas ao tratamento 10/25 a atividade específica da H⁺-PPase é 3,2 vezes superior ao controle (25/25), já no tratamento 10/10 o aumento foi de 1,5 vezes em relação ao 25/25 (Figura 1F).

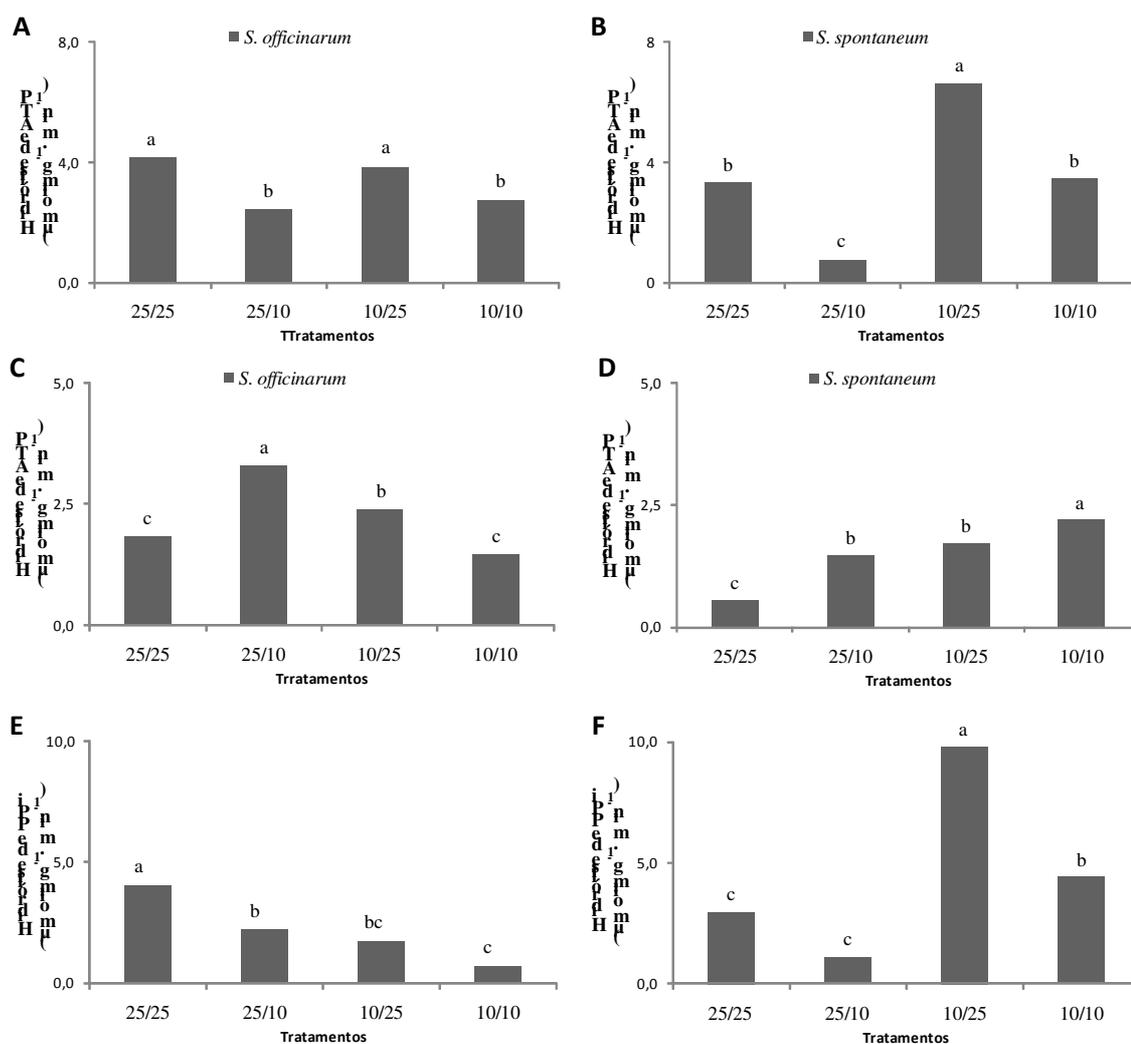


Figura 1: Atividade específica da P-ATPase da *S. officinarum* (A), P-ATPase da *S. spontaneum* (B), V-ATPase da *S. officinarum* (C), V-ATPase da *S. spontaneum* (D), H⁺-PPase da *S. officinarum* (E) e H⁺-PPase da *S. spontaneum* (F), de vesículas microsossomais extraídas de colmo cana-de-açúcar com 3 meses de idade, cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 25°C (25/25); cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 10°C (25/10); cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 25°C (10/25) e; cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 10°C (10/10). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a p>0,05.

Gradiente de H⁺

Foi mensurado o transporte de H⁺ da P-ATPase, da V-ATPase e da H⁺-PPase. No parental *S. officinarum* foi observado que a velocidade inicial (V₀) da P-ATPase é reduzida no tratamento 25/10 quando comparado com o controle, mas a $\Delta F_{\text{máx}}$ que expressa o gradiente de H⁺ formado pelas bombas eletrogênicas, não é alterada, já no tratamento 10/25 a V₀ permanece igual ao controle (25/25) com aumento da $\Delta F_{\text{máx}}$, contudo, no 10/10 tanto a V₀ quanto a $\Delta F_{\text{máx}}$ são anuladas (Figura 2A). Na *S. spontaneum*, houve pouca variação da V₀ entre os tratamentos 25/25, 25/10 e 10/10, no entanto, foi observado estímulo da V₀ no tratamento 10/25 (Figura 2B). Com relação a $\Delta F_{\text{máx}}$, houve redução nos tratamentos 25/10 e 10/10, mas no tratamento 10/25 ocorreu aumento da $\Delta F_{\text{máx}}$ de 3,6 em relação ao 25/25 (Figura 2B).

A V₀ e a $\Delta F_{\text{máx}}$ da V-ATPase da *S. officinarum* não apresentaram diferença entre os tratamentos 25/25 e 10/25. Contudo foram anuladas nos tratamentos 25/10 e 10/10 (Figura 2C). No parental *S. spontaneum* houve estímulo de 2,8 e 4,0 vezes da V₀ e da $\Delta F_{\text{máx}}$, respectivamente, no tratamento 10/25, enquanto que nos tratamentos 25/10 e 10/10 estes parâmetros também foram anulados (Figura 2D).

Em relação à V₀ da H⁺-PPase da *S. officinarum* houve pouco estímulo nos tratamentos 25/10 e 10/25, já no tratamento 10/10 a V₀ ficou similar ao 25/25, no entanto, a $\Delta F_{\text{máx}}$ do tratamento 25/10 aumentou aproximadamente 2 vezes em relação ao controle (25/25), sendo inibida cerca de 2 vezes no tratamento 10/25, contudo, houve estímulo de 2,0 vezes da $\Delta F_{\text{máx}}$ no tratamento 10/10 (Figura 2E). Na *S. spontaneum*, a V₀ foi inibida no tratamento 25/10 e estimulada nos tratamentos 10/25 e 10/10 em relação ao controle (Figura 2F), a $\Delta F_{\text{máx}}$ aumentou cerca de 5 vezes no tratamento 10/25 e 4 vezes para o tratamento 10/10 (Figura 2F).

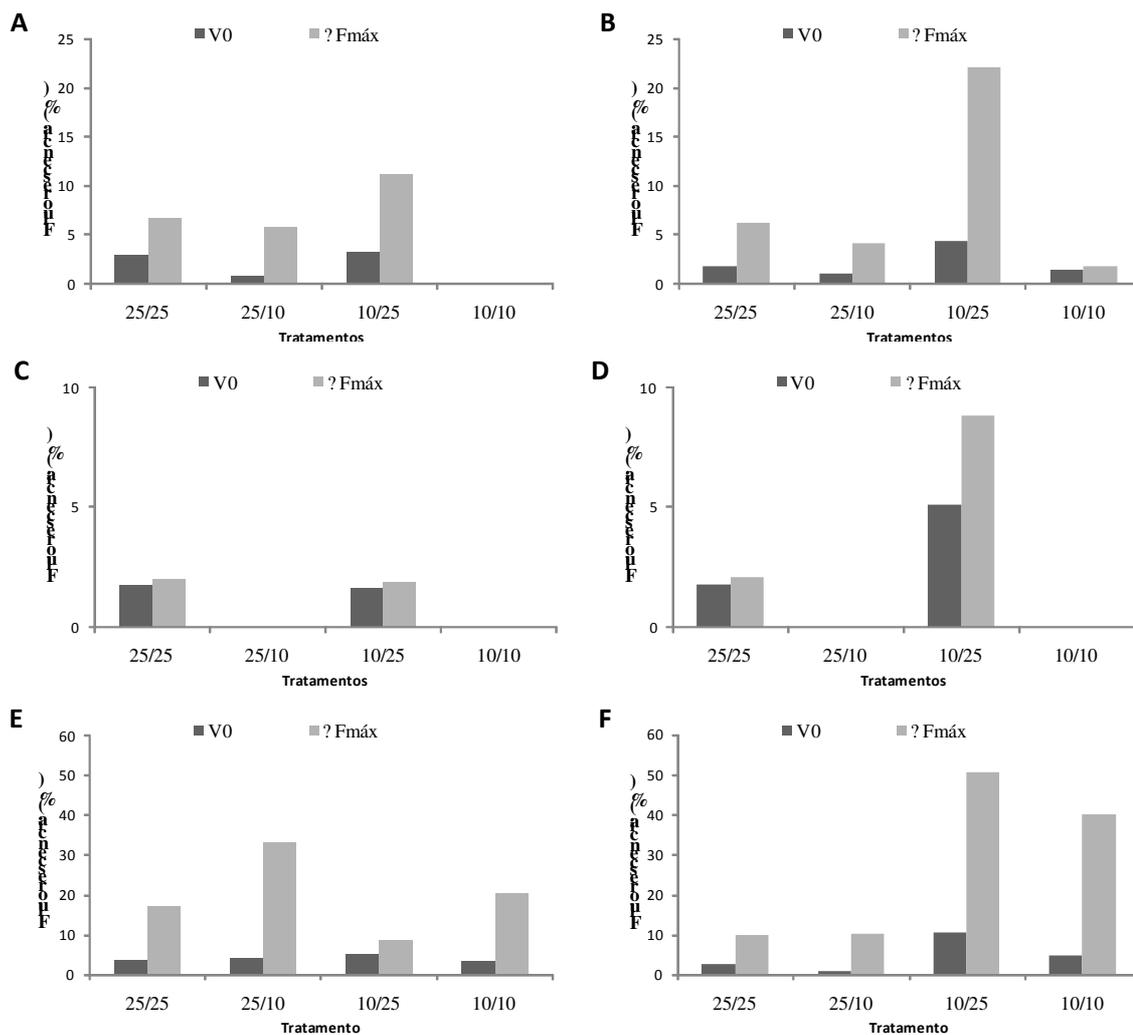


Figura 2: Velocidade inicial de transporte de H^+ (V_0) e variação da fluorescência máxima ($\Delta F_{máx}$) mediadas pela P-ATPase da *S. officinarum* (A), P-ATPase da *S. spontaneum* (B), V-ATPase da *S. officinarum* (C), V-ATPase da *S. spontaneum* (D), H^+ -PPase da *S. officinarum* (E), e H^+ -PPase da *S. officinarum* (F). As análises foram feitas em vesículas extraídas dos colmos da *S. officinarum* e *S. spontaneum* com 3 meses de idade. Foram realizados os tratamentos: cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 25°C (25/25); cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 10°C (25/10); cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 25°C (10/25) e; cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 10°C (10/10).

Acoplamento das bombas de H⁺

A taxa de acoplamento das bombas de H⁺ é obtida pela razão entre a velocidade inicial do transporte de H⁺ (V₀) e a hidrólise de ATP ou PPI. Na Tabela 1 são apresentados os resultados do acoplamento das bombas de H⁺. Observou-se que o acoplamento da P-ATPase da *S. officinarum* reduziu no tratamento 25/10 e aumentou no tratamento 10/25 em relação ao controle, enquanto no tratamento 10/10 foi anulado (Tabela 1). Na *S. spontaneum*, observou-se que a P-ATPase aumentou o acoplamento nos tratamentos 25/10 e 10/25, e foi reduzido no tratamento 10/10. A V-ATPase da *S. officinarum* foi desacoplada totalmente nos tratamentos 25/10 e 10/10, já no tratamento 10/25 foi reduzido em relação ao controle, na *S. spontaneum* também houve o desacoplamento nos tratamentos 25/10 e 10/10, enquanto no tratamento 10/25 foi reduzido (Tabela 1). Na *S. spontaneum*, foi observado que o acoplamento da H⁺-PPase reduziu em todos os tratamentos em relação ao controle (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de acoplamento das bombas de H⁺ que são obtidos pela razão entre a velocidade inicial do transporte de H⁺ (V₀) e a hidrólise de ATP (ou PPI). Foram realizados os seguintes tratamentos: cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 25°C (25/25); cultivo em casa de vegetação e ensaio *in vitro* a 10°C (25/10); cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 25°C (10/25) e; cultivo em BOD a 10°C e ensaio *in vitro* a 10°C (10/10).

Tratamentos	<i>S. officinarum</i>			<i>S. spontaneum</i>		
	P-ATPase	V-ATPase	H ⁺ -PPase	P-ATPase	V-ATPase	H ⁺ -PPase
	V ₀ .AE ⁻¹					
25/25	0,69	0,94	0,93	0,56	3,28	1,41
25/10	0,31	0,00	1,27	1,45	0,00	0,81
10/25	0,83	0,69	2,98	0,67	2,98	1,09
10/10	0,00	0,00	4,47	0,41	0,00	1,07

Acúmulo de sacarose, glicose e frutose

Foram mensuradas as concentrações de glicose, frutose e sacarose nos tecidos do colmo, com a finalidade de avaliar o metabolismo de carboidratos das canas. Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os resultados dos teores de açúcares. Não houve diferença estatística na *S. officinarum* cultivada a 25 ou 10°C (Tabela2). A frutose aumentou aproximadamente 4 vezes quando a *S. officinarum* foi cultivada a 10°C, a sacarose aumentou 1,6 vezes no tratamento a 10°C (Tabela2). Tanto a glicose quanto a frutose não apresentaram diferença na *S. spontaneum* cultivada a 25 ou 10°C, mas a sacarose apresentou redução de 6 vezes (Tabela 3)

Tabela 2: Teor de açúcares em colmos de plantas de *S. officinarum* 3 meses de idade. Plantas cultivadas em casa de vegetação (*S. spontaneum* 25), plantas cultivadas em BOD durante 30 dias a 10°C (*S. spontaneum* 10). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a $p>0,05$)

<i>S. officinarum</i>	Glicose	Frutose	Sacarose
	nmol.g massa fresca ⁻¹		
25°C	1262,76 a	1185,44 b	867,33 b
10°C	1498,79 a	4715,10 a	1457,82 a

Tabela 3: Teor de açúcares em colmos de plantas de *S. spontaneum* com 3 meses de idade. Plantas cultivadas em casa de vegetação (*S. spontaneum* 25), plantas cultivadas em BOB durante 30 dias a 10°C (*S. spontaneum* 10) Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a $p>0,05$.

<i>S. spontaneum</i>	Glicose	Frutose	Sacarose
	nmol.g massa fresca ⁻¹		
25°C	1350,74 a	1354,83 a	3268,68 a
10°C	993,23 a	1249,39 a	549,82 b

DISCUSSÃO

A cultura da cana-de-açúcar tem grande importância econômica tanto na produção de açúcar quanto na produção de etanol (Lopes, 2007). A temperatura é um fator que influencia diretamente no desenvolvimento da cultura, em baixas temperaturas, o crescimento do colmo é praticamente paralisado. Novas variedades de cana resistente ao frio vêm sendo desenvolvidas, e apresentam bons resultados, como alta produtividade e maior acúmulo de açúcares (Verissimo et al., 2012). Contudo, ainda há carência de pesquisa básica, principalmente nas áreas de bioquímica da cana-de-açúcar relacionada com a resistência ao frio e acúmulo de açúcares.

Os resultados mostram que quando o cultivo é feito em condições normais de temperatura, a atividade da P-ATPase não difere entre os parentais, contudo, quando o cultivo é feito a baixa temperatura a *S. spontaneum* apresenta maior atividade dessa enzima (Figura 1A). Esses resultados sugerem que a P-ATPase está contribuindo com capacidade que a *S. spontaneum* tem para resistir condições adversas, visto que o acoplamento da enzima não é afetado nas condições de baixa temperatura, enquanto que ocorre o desacoplamento da P-ATPase na *S. officinarum* (Tabela 1). A P-ATPase além de energizar transportadores de íons e solutos, também controla funções importantes para o crescimento vegetal, como por exemplo, alongação e divisão celular (Serrano, 1989), regulação do pH intracelular, tolerância a estresse (Sondergaard et al., 2004; Morsomme e Boutry, 2000; Palmegren, 1991). Zhang et al., (2006) e Chen

et al., (2000) observaram aumento da atividade da P-ATPase em condições de baixa temperatura em uva e arroz, respectivamente, onde a P-ATPase manteve-se ativa durante o adaptação ao frio.

A *S. officinarum* apresentou atividade da V-ATPase maior do que a *S. spontaneum*, mas no tratamento mais severo (10/10) a *S. spontaneum* apresentou maior atividade da enzima. Outro aspecto observado foi que quanto mais rigoroso o tratamento maior a hidrólise da V-ATPase da *S. spontaneum* (Figura 1B). Darley et al. (1995), verificaram que a atividade da V-ATPase não foi alterada em plantas de feijão cultivadas a 4°C, mas os ensaios experimentais foram feitos em temperatura ambiente. Nessa condição, as membranas celulares encontram-se mais fluidas, permitindo o funcionamento normal da enzima, contudo, nosso trabalho mostra que a temperatura do ensaio *in vitro* é crucial para a modulação dessa bomba protônica. O trabalho de Darley et al., (1995), mostra também que a V-ATPase não apresenta um aumento em seus níveis de transcritos, mais uma indicação de que a modulação desta enzima está relacionada com a integridade do tonoplasto.

Por outro lado, nos ensaios *in vitro* a 10°C ocorreu o desacoplamento total da V-ATPase em ambos os parentais (Tabela 1), indicando modulação biofísica da enzima, ou seja, a fluidez da membrana irá definir o funcionamento da enzima.

Esses resultados corroboram com a literatura, que esta bomba protônica é desacoplada estruturalmente com concomitante inibição de suas funções em condições de resfriamento (Wright et al., 1982; Adachi et al., 1990; Matsura-Endo et al., 1992; Kasamo et al., 2000), as quais passam a ser supridas pela atividade das H⁺-PPases.

O processo de inativação das V-ATPases pelo estresse por resfriamento foi descrito como envolvendo três etapas: desprendimento das subunidades da parte periférica da ATPase, inativação da enzima e a degradação parcial do tonoplasto (Matsura-Endo et al., 1992). O desacoplamento da enzima ocorre tanto na *S. Spontaneum* quanto na *S. officinarum* nos ensaios *in vitro* a baixa temperatura e é hipercoplada nos ensaios *in vitro* a 25°C independente da condição de cultivo da *S. spontaneum*, enquanto que na *S. officinarum* o hipercoplamento só acontece quando o cultivo foi a 25°C.

O desacoplamento da V-ATPase parece ser momentâneo nos dois parentais, pois quando se altera a temperatura dos ensaios *in vitro* para 25°C, a

V-ATPase reacopla mesmo quando as plantas são cultivadas em temperatura baixa. Kasamo et al., (2000) sugerem, que a redução da atividade da H⁺-ATPase causado pelo frio é devido à diminuição na fluidez na superfície da bicamada lipídica da tonoplasto, causado pelas mudanças nos glicolipídeos, corroborando com dados que mostram o desacoplamento durante o ensaio em baixa temperatura. Em um recente trabalho, (Zoncu et al., 2012) mostraram que a V-ATPase, não é uma enzima que apenas bombeia H⁺ para o interior do vacúolo, mas seu papel pode estar relacionado com vias de sinalização muito complexas, participando ativamente na sinalização inerente aos processos de crescimento celular, atuando juntamente com o complexo mTOR, que funciona como um sensor para condições favoráveis ou desfavoráveis para o crescimento da célula.

Além do mais já foi mostrado que subunidades dissociadas da V-ATPase atuam com fator de transcrição, regulando a expressão de alguns genes. Em algumas células especializadas que apresentam vacúolo super acidificados, existem duas isoformas da família da ATPase do tipo P, presentes no tonoplasto, estas isoformas são fundamentais para a acidificação vacuolar, esta via de acidificação do tonoplasto é independente da V-ATPase (Faraco et al., 2014).

A H⁺-PPase teve maior atividade na *S. spontaneum* do que na *S. officinarum* nos tratamentos de baixa temperatura (Figura 1C). Isso mostra que a *S. spontaneum* apresenta maior capacidade de adaptação à condição climática adversa. O aumento da atividade da H⁺-PPase em condições de estresse já foi descrito por diversos autores (Hernández-Domínguez et al., 2012; Liu et al., 2010; Park et al., 2005; Fukuda et al., 2004; Kasai et al., 1998; Darley et al., 1996; Carystinus et al., 1996). O acoplamento da enzima foi maior na *S. officinarum* quando comparado com a *S. spontaneum* na condição de cultivo a 10°C, justamente quanto as enzimas dependentes de ATP apresentaram o acoplamento anulado (Tabela 1). Foi observado por Venancio et al., (2013), que a H⁺-PPase apresentou hiperacoplamento, caracterizada por um grande estímulo do gradiente eletroquímico não acompanhada por um estímulo equivalente na hidrólise de PPi, e que estas respostas são comuns às espécies mais rústicas.

A H⁺-PPase também pode estar envolvida no acúmulo de sacarose no vacúolo, já que o transportador de sacarose do vacúolo é um transportador do tipo antiporter (sacarose/H⁺), pois na *S. spontaneum* não houve hiperacoplamento da H⁺-PPase e, conseqüentemente, não aumentou o acúmulo

sacarose, ocorrendo redução de sacarose (Tabela 3 e Figura 3). Assim o estresse causado pelo frio e o hiper-acoplamento da H^+ -PPase na *S. officinarum* estimulam o aumento de frutose e acúmulo de sacarose nos colmos (Tabela 2 e Figura 3).

As bombas de H^+ são responsáveis pela energização de transportadores secundários, desta forma estão relacionadas ao acúmulo da sacarose na cana-de-açúcar. Sendo assim, estas enzimas puderam ser utilizadas como marcadores bioquímicos no processo de seleção de novas cultivares da cana-de-açúcar.

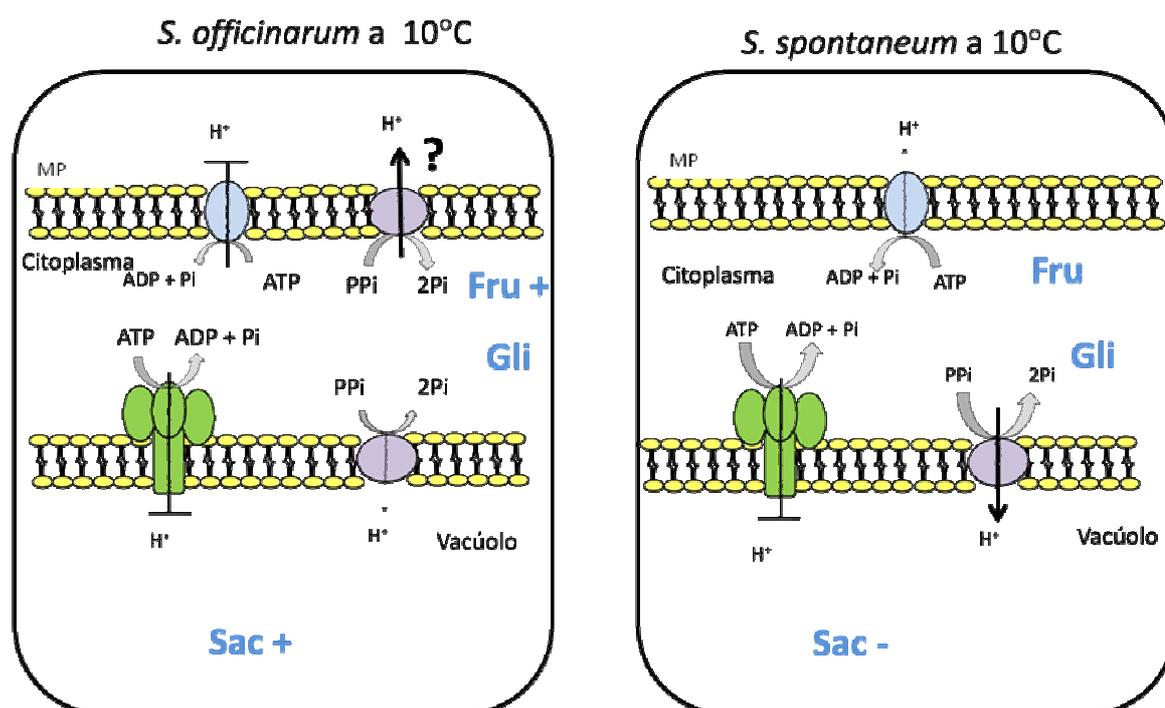


Figura 3: Esquema representativo da atividade de hidrólise de ATP ou PPi , gradiente das bombas de H^+ e acúmulo de açúcares na condição de baixa temperatura ($10/10$), em *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Ocorreu o hiper-acoplamento da H^+ -PPase na *S. officinarum* juntamente com o acúmulo de sacarose nos colmos durante o estresse causado pelo frio, enquanto que o transporte de H^+ da V-ATPase é anulado em ambos os parentais, já o transporte de H^+ da P-ATPase foi reduzido na *S. spontaneum* e anulado *S. officinarum*.

Plantas de clima temperado promovem a síntese de moléculas crioprotetoras, como os açúcares solúveis, alcoóis de açúcar, e compostos nitrogenados de baixo peso molecular (Janska et al., 2010). Esses compostos agem com *CORs* (gene responsivo ao frio), proteínas desidratadas e proteínas de choque térmico que estabilizam os fosfolipídios de membrana, as proteínas de

membrana e citoplasmáticas, mantendo as interações hidrofóbicas e homeostase de íons, eliminando as espécies reativas de oxigênio (Janska et al., 2010).

Sistemas de transdução de energia, como as bombas de prótons, desempenham papéis importantes nas células vegetais, em vários processos fisiológicos e nos mecanismos de tolerância a estresses, via geração de gradientes eletroquímicos de H^+ nas membranas biológicas (Serrano, 1989; Palmgren, 1998 e 2001). As H^+ -PPases são sistemas que em condições normais possuem uma funcionalidade secundária em relação às H^+ -ATPases. Todavia, em condições de estresse energético, como o induzido durante estresses por baixa temperatura (Zhang et al. 2011; Carystinos et al., 1995), anoxia (Carystinos et al., 1995; Liu et al., 2010) e deficiência de nutrientes (Hernández-Domínguez et al., 2012; Kasai et al., 1998), o gradiente eletroquímico gerado pelas H^+ -PPases passa a assumir um papel crucial na energização das biomembranas.

Ovar et al. (2000) observaram que o DMSO (dimetilsulfóxido), que é conhecido por enrijecer a membrana, induziu a expressão do gene *COR*, mesmo em plantas em temperatura normal e plantas tratadas com álcool benzílico conhecido por deixar a membrana mais fluida, preveniu a indução do gene *COR* em plantas submetidas a baixa temperatura. O choque térmico frio causa o enrijecimento da membrana que induz uma assinatura de Ca^{2+} no citoplasma, o aumento de Ca^{2+} regula a expressão do gene *COR*, indicando que o Ca^{2+} está envolvido no mecanismo de percepção do frio (Knight et al., 1991).

Além da membrana plasmática, os cloroplastos podem também ter um papel importante na percepção da temperatura, pois em condições de baixa temperatura, a captura de luz do aparelho fotossintético não é afetada, porém, o metabolismo é reduzido nas folhas, assim o fotossistema II não dissipa essa energia, ocorrendo a fotoinibição (Oquist e Huner, 2003). Desta forma são geradas espécies reativas de oxigênio (ROS) que danificam o aparato fotossintético (Tyystjarvi, 2013). Apesar de muitas evidências fisiológicas para a hipótese de que os cloroplastos são sensores de frio, não há informações a níveis moleculares suficientes que levam a elucidação deste mecanismo (Miura e Furumoto, 2013). Outro mecanismo usado pelas plantas na percepção do frio é a fosforização de proteínas, por exemplo, as MPK4 e MPK6 são fosforiladas por MKK2 (MAP kinase kinase2) quando a planta é exposta ao frio, ao mesmo tempo ocorre o aumento de *CBF/DREB1s* ([CRT (C-repeat)/DRE (*dehydration*

responsive-element] binding proteins) (Teige et al., 2004). A SAMK (MPK de alfa) é ativada quando a membrana plasmática se torna rígida por causa do frio, SAMK é inibida pelo o bloqueio de influxo de Ca^{2+} (Sangwan et al., 2002). Assim, fica evidente que existem várias vias de sinalização para promover respostas ao frio (Miura e Furumoto, 2013)

CONCLUSÃO

O hiper-acoplamento da H⁺-PPase, observado na *S. officinarum* aumenta o acúmulo de sacarose nos colmos durante o estresse causado pelo frio. O transporte de H⁺ da V-ATPase é anulado nos ensaios de baixa temperatura *in vitro* em ambos os parentais, e o transporte de H⁺ da P-ATPase é reduzido nos ensaios *in vitro* à baixa temperatura, mas na *S. spontaneum* ocorre rápida ativação da P-ATPase quando a enzima volta para uma condição de temperatura de 25°C *in vitro*, sugerindo que a *S. spontaneum* apresenta maior adaptação ao estresse, contudo ocorre a redução do teor de sacarose.

REFERÊNCIAS

Adachi P, Puopolo K, Marquez-Sterling N, Arai H, Forgac M (1990) Dissociation, cross-linking, and glycosylation of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem* 265: 967-973.

Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Carystinos, C.D.; MacDonald, H.R.; Monroy, A.F.; Dhindsa, R. S.; Poole, Ronald J. (1995) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiology*. 108: 641-649.

Chen, Y.H., Shen, Z.G., Liu, Y.L. (2000) Effects of chilling and high pH stresses on the ATPase activities of plasma membrane and tonoplast vesicles isolated from rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Acta Phytophysiol.* 26 407–412.

Darley, C. P.; Davies, J. M.; Sanders D. (1995) Chill-Induced Changes in the Activity and Abundance of the Vacuolar Proton-Pumping Pyrophosphatase from Mung Bean Hypocotyls'. *Plant Physiology* 109: 659-665.

De Michelis, M. I., Spanswick, R. M. (1986) H⁺-pumping drive by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corns roots. *Plant Physiology* 81:542-547.

Façanha, R. A.; Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in Tonoplast Vesicles from Maize Coleoptiles and Seeds. *Plant Physiology*, v. 116, n. 4, p. 1487-1495.

Faraco, M., Spelt, C., Blied, M., Verweij, W., Hoshino, A., Espen, L., Prinsi, B., Jaarsma, R., Tarhan, E., Boer, A. H. de, Di Sansebastiano, G., Koes, R., Quattrocchio, F. M. (2014). Hyperacidification of Vacuoles by the Combined Action of Two Different P-ATPases in the Tonoplast Determines Flower Color. *Cell Reports*, Vol 6, Issue 1, p. 32-43.

Ferjani A, Segami S, Horiguchi G, Sakata A, Maeshima M, Tsukaya H. (2012) Regulation of pyrophosphate levels by H⁺-PPase is central for proper resumption of early plant development. *Plant Signaling & Behavior*. 7(1):38-42.

Fiske, C.F., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375.

Hernández-Domínguez, E. E.; Valencia-Turcotte, L. G.; Rodríguez-Sotres; R. (2012). Changes in expression of soluble inorganic pyrophosphatases of *Phaseolus vulgaris* under phosphate starvation. *Plant Science*, v187 pag 39– 48.

Janská A, Marsík P, Zelenková S, Ovesná J (2010) Cold stress and acclimation—what is important for metabolic adjustment? *Plant Biol* (Stuttg) 12: 395–405.

Kasamo, K.; Yamaguchi, M.; Nakamura, Y. (2000) Mechanism of the Chilling-Induced Decrease in Proton Pumping across the Tonoplast of Rice Cells. *Plant & cell Physiology*. 41(7): 840-849.

Knight, M.R.; Campbell, A.K.; Smith, S.M.; Trewavas, A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352, 524–526.

Liu, Q.; Zhang, Q.; Burton, R. A.; Shirley, N.J.; Atwell, B.J. (2010) Expression of vacuolar H⁺-pyrophosphatase (OVP3) is under control of an anoxia-inducible promoter in rice. *Plant Molecular Biology*. 72:47–600.

Lopes V.R. Divergência genética entre clones de cana-de-açúcar da serie RB97. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Curitiba, UFPR, 2007.87f.

Matsuoka, S.; Garcia, A. A. F.; Arizono, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: Borém, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa : Editora UFV, p.205-251, 2005.

Matsura-Endo, C.; Maeshima, M.; Yoshida, S. (1992) Mechanism of the Decline in Vacuolar H⁺-ATPase Activity in Mung Bean Hypocotyls during Chilling. *Plant Physiol*. 100, 718-722.

Miura, K. and Furumoto, T. (2013). Cold Signaling and Cold Response in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5312-5337.

Oquist, G.; Huner, N.P. (2003) Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 329–355.

Orvar, B.L.; Sangwan, V.; Omann, F.; Dhindsa, R.S. (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23, 785–794.

Palmgren M.G (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, pp. 817–845.

Palmgren M.G. (1998) Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Adv Botanical Res*, 28 pp. 1–69.

Palmgren, M.G. (1991) Regulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Physiol. Plant* 83: 314-323.

Park S, Li J, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang H, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA (2005) Up-regulation of H⁺-pyrophosphatase (H⁺-Ppase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Sangwan, V.; Orvar, B.L.; Beyerly, J.; Hirt, H.; Dhindsa, R.S. (2002) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J.* 31, 629–638.

Santos, I.R.I. 2000 Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 70-84.

Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 40 pp. 61–94.

Sondergaard, T.E.; Schulz, A.; Palmgren, M.G. (2004) Energization of transport processes in plant. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 136: 2475-2482. Stitt, M.; Lilley, R.M.C.; Gerhardt, R.; Heldt, H.W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 174: 518-552.

Teige, M.; Scheikl, E.; Eulgem, T.; Doczi, R.; Ichimura, K.; Shinozaki, K.; Dangl, J.L.; Hirt, H. (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Mol. Cell*, 15, 141–152.

Tyystjarvi, E. (2013) Photoinhibition of photosystem II. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 300, 243–303.

Venancio, J. B., Catunda, M. G. Ogliari, J. Rima, J. A. H., Okorokova-Façanha, A. L., Façanha, A.R. (2013) A Vacuolar H(+)-Pyrophosphatase Differential Activation and Energy Coupling Integrate the Responses of Weeds and Crops to Drought Stress. *Biochimica et Biophysica Acta*,

Verissimo, M. A. A.; Silva, S. D. A.; Aires, R. F.; Daros, E.; e Panziera, W. (2012) Adaptabilidade e estabilidade de genótipos precoces de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.47, n.4, p.561-568.

Wright, L. C.; McMurchie, E. J.; Pomeroy, M. K.; Raison, J. K. (1982) Thermal Behavior and Lipid Composition of Cauliflower Plasma Membranes in Relation to ATPase Activity and Chilling Sensitivity. *Plant Physiol.* 69, 1356-1360.

Zhang, J.; Li, J.; Wang, X.; Chen, J. (2011) OVP1, a vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance *Plant Physiology and Biochemistry* 49 33-38.

Zhang, J. H.; Liu, Y. P.; Pan Q. H.; Zhan, J.C.; Wang, X. Q.; Huang, W. D. (2006) Changes in membrane-associated H⁺-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Science*, 170, 4, 768-777.

3.2 EXTRATO FOLIAR DE *Manihot esculenta* Crantz. COMO PROMOTOR DE QUEBRA DE DORMÊNCIA E MODULADOR DA BROTAÇÃO DE GEMAS EM CAQUIZEIRO

**Janaína Aparecida Hottz Rima^a, Luis Alfredo dos Santos Prado e Arnaldo^a
Rocha Façanha^{a*}**

RESUMO

O caquizeiro *Diospyros kaki* L. é uma frutífera de clima tipicamente subtropical e apresenta boa capacidade de adaptação às condições climáticas do país. É uma frutífera que entra em dormência, tendo seu crescimento vegetativo paralizado no inverno. Para a saída do estado dormente é necessário horas de frio dentre outros fatores ambientais. Atualmente, são utilizados produtos químicos que quebram a dormência, antecipando e uniformizando a safra, contudo são produtos tóxicos ao ser humano e o modo de ação destes produtos ainda não foram elucidados. Assim este trabalho propõe um produto natural alternativo ao uso dos produtos convencionais. Para tanto, foi elaborado o extrato de mandioca, que possui naturalmente em sua composição compostos cianogênicos similares aos presentes em produtos comerciais. Foram realizadas avaliações da taxa de brotação e ensaios bioquímicos de atividade enzimática da P-ATPase, V-ATPase e H⁺-PPase. O extrato de mandioca, mostra-se eficiente na quebra da dormência de gemas do caquizeiro tanto nos ensaios feitos no campo quanto na casa de vegetação. Além disso, foi observado o aumento da atividade da P-ATPase de 400% nas gemas tratadas com o extrato de mandioca em relação ao controle, enquanto que o aumento da atividade da enzima nos tratamentos com Dormex® e cianamida hidrogenada foi superior a 200%. A Atividade da H⁺-PPase também

foi alterada pelos tratamentos. O extrato de mandioca induziu o aumento de 220%, e os tratamentos com Dormex® e Cianamida hidrogenada foram de 150 e 470%, respectivamente. Porém, a V-ATPase não foi alterada com o extrato de mandioca, sendo aumentada sua atividade com o Dormex® em cerca de 120% e redução de 84% com a cianamida hidrogenada. Conclui-se que o extrato de mandioca promove a quebra da dormência de gemas de caqui e ainda estimula a atividade da P-ATPase e PPase.

Palavras chaves: Frutíferas, bombas de prótons, bioenergética.

LEAF EXTRACT *Manihot esculenta* Crantz. AS DORMANCY BREAK PROMOTER AND GEMS SPROUTING MODULATOR ON PERSIMMON TREES

**Janáína Aparecida Hottz Rima^a, Luis Alfredo dos Santos Prado e Arnaldo^a
Rocha Façanha^{a*}**

ABSTRACT

The persimmon *Diospyros kaki* L., is a typical subtropical climate fruitful and shows good adaptability to climatic conditions of the country. It is a fruitful that goes into dormancy, with its vegetative growth paralyzed in winter. To the output of the dormant state is required chilling hours among other environmental factors. Currently chemicals that break dormancy are used, anticipating and standardizing the crop, however they are toxic to humans, and the mechanism of action of these products have not yet been elucidated. So this paper proposes a natural alternative product to the use of conventional products. For that was prepared the cassava extract, which has naturally in their composition cyanogenic compounds similar to the present in commercial products. Evaluations were performed of the budding rate and biochemical assays for enzymatic activity of P-ATPase, V-ATPase and H⁺-PPase. The cassava extract, proved to be efficient in breaking dormancy of persimmon buds in both trials made in the field and in the greenhouse. Furthermore it has been observed the increase of 400% in P-ATPase activity in the buds treated with cassava extract compared to the control, while the increase of enzyme activity in the treatments with Dormex[®] and hydrogen cyanamide was greater than 200%. The H⁺-PPase activity was also altered by the treatments, the cassava extract induced an increase of 220%, and the treatment Dormex[®] and hydrogenated cyanamide was 150 and 470%, respectively. While the V-ATPase was unchanged with the cassava extract, its activity was increased with Dormex[®] by about 120% and a reduction of 84% with hidrogen cyanamide. We conclude that the cassava extract promotes dormancy breaking of persimmon tree buds and also stimulates the P-ATPase and H⁺-PPase activities.

Key words: Fruit trees, pumps proton, bioenergetics.

INTRODUÇÃO

O caquizeiro é uma planta que entra em dormência no período de inverno e a quebra dessa dormência envolve fatores internos, como balanço dos promotores e inibidores de crescimento, ou externos, como fotoperíodo, radiação solar, temperatura, entre outros, sendo a temperatura um dos fatores mais importantes quando as plantas são cultivadas em regiões com insuficiência de frio hibernal (Marodin et al., 2002). Alguns produtos são utilizados para a quebra dessa dormência, como óleo mineral, cálcio cianamida (CaCN_2), nitrato de potássio (KNO_3), paclobutrazol e cianamida hidrogenada (H_2CN_2) (Arellano, 1991; Mann et al., 1994), sendo o último o mais efetivo e mais utilizado nos sistemas produtivos (Mizobutisi et al., 2003).

A dormência é um processo natural que ocorre em grande parte das plantas de clima temperado. A dormência de gemas tem início ao final do período de diferenciação floral, se prolongando ao longo do ano, seguindo as fases de ecodormência, em que algum fator ambiental irá limitar o crescimento. Depois de paradormência, o crescimento é paralizado por influência de outros órgãos da planta, e endodormência, quando é influenciada por processos bioquímicos e fisiológicos que inibem da brotação (Lang et al., 1987).

O período de dormência mais severo varia de acordo com a espécie frutífera de clima temperado, o caquizeiro, apresenta dormência mais severa no início do mês de maio (Oliveira Filho e Carvalho, 2003). Para que ocorra brotação das gemas do caquizeiro de forma natural é necessário aproximadamente 500 h

de frio com temperatura variando de 4 a 7 °C (Faquim et al. 2007). Outro fator ambiental que influencia a quebra de dormência é a luz, o fotoperíodo possivelmente atua na redução do nível de inibidores de crescimento (Petri et al., 1996).

A dormência também pode ser rompida artificialmente, são usados produtos, como óleo mineral, cálcio cianamida (CaCN_2), nitrato de potássio (KNO_3), paclobutrazol e cianamida hidrogenada (H_2CN_2) (Arellano, 1991; Mann et al., 1994). Esses produtos afetam a bioenergética das gemas dormentes, causando um estresse energético que induzem o aumento da relação AMP/ATP nas células das gemas (Or et al., 2000), possivelmente as bombas de H^+ sofrem alterações, pois utilizam o ATP como substrato. As bombas protônicas são enzimas que geram um gradiente eletroquímico de H^+ (Taiz, 2009). Essas enzimas apresentam funções essenciais para o crescimento vegetal que envolve a “teoria do crescimento ácido” (Rayle e Cleland, 1992), e são influenciadas por estresses ambientais como baixa temperatura, anoxia e falta de nutrientes.

HIPÓTESE

Alterações na atividade das bombas H^+ podem estar relacionadas com a quebra de dormência em gemas de caquizeiro, tendo assim um papel fundamental nos processos inerentes à quebra de dormência em plantas caducifólias.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Testar a hipótese de que alterações de atividade das bombas de H⁺ possam ser usadas como efetivos indicadores no processo de quebra de dormência do caquizeiro.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade das bombas de H⁺ em gemas de caqui dormentes, após a aplicação de produtos que induzem a quebra de dormência.
- Testar o extrato foliar de mandioca como agente promotor de quebra de dormência.
- Conduzir experimentos em campo para averiguar a brotação de gemas tratadas em campo com Dormex®, Cianamida Hidrogenada e extrato foliar de mandioca.
- Avaliar a taxa brotação de gemas tratadas em casa de vegetação com Dormex®, Cianamida Hidrogenada e extrato foliar de mandioca.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Os experimentos de campo foram realizados em Sumidouro – RJ, nos anos 2012, 2013 e 2014, entre os meses de junho, julho e agosto. Os ensaios em casa de vegetação foram realizados na UENF/CBB, em Campos dos Goytacazes, nos anos de 2012, 2013 e 2014 entre os meses de junho, julho e agosto. Foram utilizadas gemas vegetativas de caqui da variedade Rama Forte, as plantas estavam com 15 anos de idade.

Preparo do extrato de mandioca

Foram coletadas folhas de mandioca adulta, cortadas e homogenizadas em liquidificador com água na proporção de 30g de folhas para cada 1L de água. Em seguida o homogenato foi filtrado e acondicionado em um pulverizador manual, foi adicionando óleo mineral 1% para melhor aderência do produto nas gemas dormentes. E logo, foi realizada a aplicação do produto, pulverizando 2L de calda por planta.

Avaliação da brotação das gemas dormentes em campo

Foram realizados experimentos de campo durante 3 anos consecutivos, em que se aplicaram diferentes produtos para induzir a quebra da dormência das gemas vegetativas do caquizeiro. Os produtos utilizados foram o Dormex®, já utilizado para quebrar a dormência de diversas plantas como, por exemplo, a uva

e o pêssego. Também foram utilizados a cianamida hidrogenada que é o princípio ativo do Dormex®, e o extrato de mandioca que vem como uma alternativa ao uso do Dormex®, já que o tal produto já está caindo em desuso por ser altamente tóxico.

Para os testes realizados em campo foram realizadas aplicações de produto comercial Dormex® na concentração 1,5% (350mM do princípio ativo), Cianamida Hidrogenda P.A. 1,5%, extrato de mandioca 30g/L e o controle foi aplicado água. Após 24h foram coletadas as gemas em que foram aplicados os produtos para realizar ensaios bioquímicos. O acompanhamento das brotações foi mensal com registros fotográficos.

Avaliação da brotação das gemas dormentes em casa de vegetação

Para os experimentos em casa de vegetação foram coletados ramos contendo as gemas em dormência entre os meses de junho e julho, foram selecionados ramos com 1 ano de idade, com aproximadamente 50 cm de comprimento. Os ramos foram cortados e cada estaca contendo de 1 a 2 gemas. Em seguida, as estacas foram acondicionadas em bandejas de isopor de 200 células, preenchidas com substrato comercial. Foi realizada a irrigação diária. O acompanhamento das estacas foi individual a cada 1dia num período de 21 dias. Na primeira fase foram feitos os seguintes tratamentos: controle (água), 1,5% Dormex® + 1,0% óleo mineral; extrato de mandioca 30g/L + 1,0% óleo mineral, 1,5% cianamida hidrogenada P.A + 1,0% óleo mineral. Os produtos foram pincelados nas gemas. Foram consideradas gemas brotadas assim que surgiram modificações na coloração da gema, apresentando coloração amarelo-esverdeado no ápice da gema. Com base nestes dados, foi calculado o percentual de brotação acumulada por dia.

Obtenção da fração microssomal

As gemas coletadas no campo foram utilizadas para os ensaios bioquímicos. A fração microssomal foi obtida das gemas de caqui rama 24 horas após os tratamentos. Essa fração foi obtida a partir da centrifugação diferencial (De Michelis e Spanswich, 1986). O material foi cortado, pesado e triturado e em seguida homogeneizado em meio tamponado modificado. O tampão de extração foi composto de HEPES-KOH 50 mM (pH 7,5), sacarose 250 mM, KCl 150 mM,

EDTA 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM. Foram alteradas as concentrações de PVPP e BSA para 1,2 % e 1,1%, respectivamente, na relação massa de tecido: volume de tampão de 1:2. A manipulação das soluções foi realizada em temperatura entre 0 e 4°C. O pH foi mantido entre 7,6 e 8,0. O homogenato resultante foi filtrado utilizando-se miracloth e submetido a centrifugação (3.000 x g, 15 min.). O precipitado foi descartado para a remoção de células não rompidas e núcleos. Para o isolamento das mitocôndrias, o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g, 15 min. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação (100.000 x g, 50 min.). O precipitado dessa centrifugação foi solubilizado em solução tampão contendo: HEPES-KOH 25 mM, sacarose 250mM, EDTA 0,1 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM.

Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As amostras foram ensaiadas em duplicata, com as concentrações de BSA variando de 0 a 20 µg, com intervalos de 2 µg. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 595 nm de comprimento de onda.

Atividade das H⁺-ATPases, V-ATPase e H⁺-PPase

A atividade das bombas foi determinada colorimetricamente conforme descrito por Fiske e Subbarrow (1925), medindo-se a quantidade de fosfato inorgânico liberado pela reação. A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada pela adição de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10% (v/v). Composição do meio reacional: HEPES-KOH pH 6,5 ou 7,0, 50 mM; MgCl₂ 3 a 5 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM e 50 µg de proteína. A hidrólise de ATP representa a atividade sensível a 0,2 mM de vanadato, ou sensível a 5 nM concanamicina A, e para hidrólise de PPI representada a atividade sensível a KCl 100 mM. A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + Ácido Ascórbico 1% (100:1) e, após 10 minutos, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nessa reação, o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Em todos os experimentos, a atividade

hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 25 °C, com ou sem vanadato, com ou sem concanamicina A ou como ou se KCl e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase/PPase.

Delineamento estatístico

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, nas diferentes épocas de tratamento. Para os experimentos de campo foram os seguintes tratamentos: Controle (água), Dormex® 1,5% + 1,0% óleo mineral, Cianamida Hidrogenada P.A. 1,5% + óleo mineral 1,0%, extrato de mandioca 30g/L + 1,0% óleo mineral. Para os experimentos em casa de vegetação foram os seguintes tratamentos: Controle (água), Dormex® 1,5% + óleo mineral 1,0%, cianamida hidrogenada P.A 1,5% + óleo mineral 1,0%, extrato de mandioca 15g/L + óleo mineral 1,0%, extrato de mandioca 30g/L + óleo mineral 1,0% e extrato de mandioca 60g/L + óleo mineral 1,0%.

RESULTADOS

Brotação das gemas dormentes em campo

Observa-se que no controle (Figura 1A), o início da brotação natural da brotação, que ocorre corre apenas no mês de agosto. No tratamento com extrato de mandioca (Figuras 1B e E) a brotação já se encontra num estágio bastante avançado, pois as folhas já encontram em desenvolvimento e totalmente expandidas. Na Figuras 1C e F, as plantas foram tratadas com o produto comercial Dormex®. Um mês após o tratamento, as gemas já estão brotando (Figura 1F), no segundo mês a planta já apresenta folhas desenvolvidas (Figura 1C). No tratamento com cianamida hidrogenada P.A. (Figuras 1D e G) a dormência também foi quebrada da mesma forma que ocorreu no tratamento com Dormex®.

Brotação das gemas dormentes em casa de vegetação

Além dos experimentos em campo, também foram realizados experimentos em casa de vegetação, que consistiu em coleta de ramos em junho de 2013, contendo as gemas dormentes e cortadas em mini-estacas de uma a duas gemas como apresentado na Figura 2. Observa-se que o controle a gema permanece dormente (Figura 2A), que o tratamento com cianamida hidrogenada houve a promoção da quebra da dormência (Figura 2B) e que também a brotação das gemas foi induzida nas diferentes doses testadas do extrato de mandioca (Figura 2C, D e E).

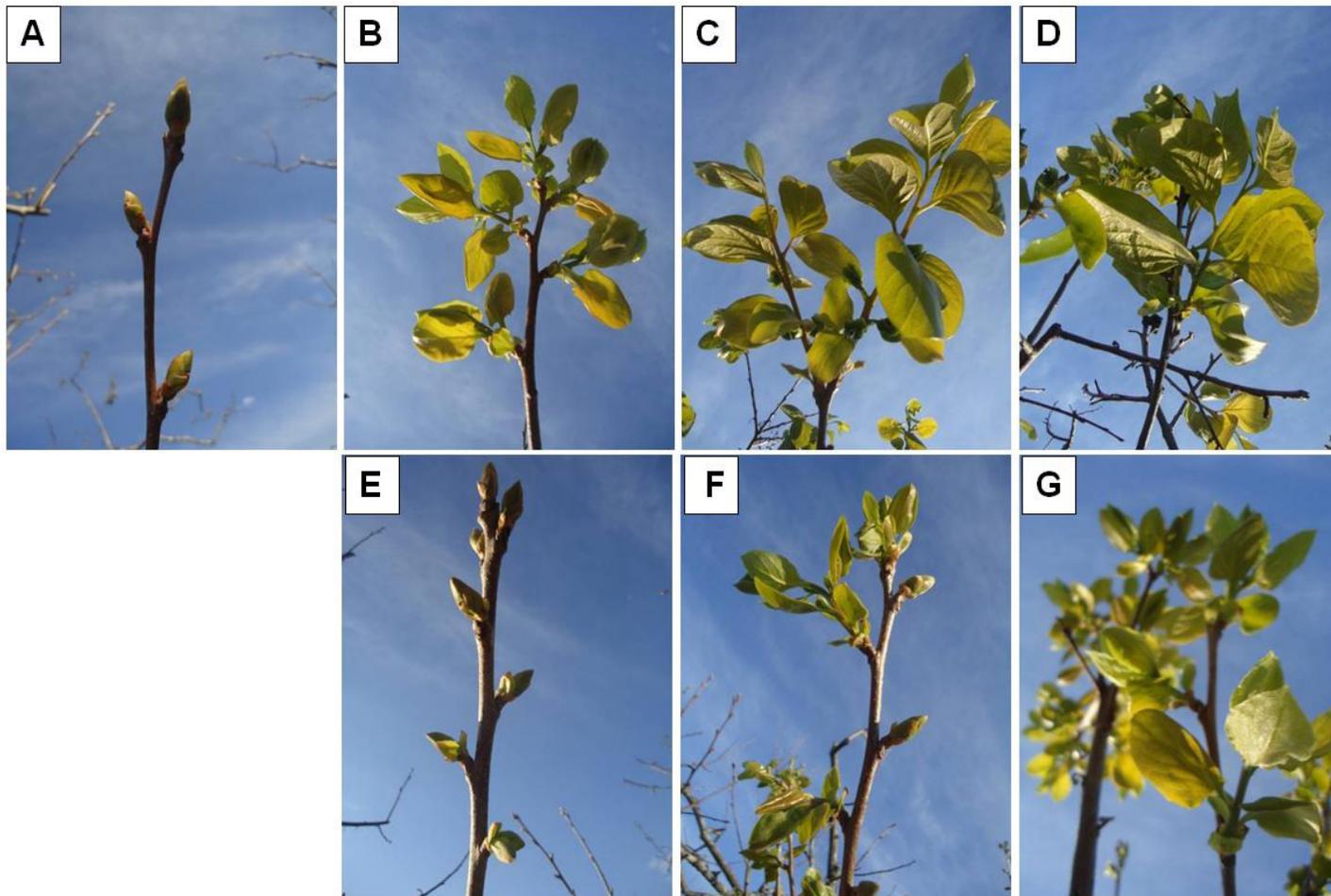


Figura 1: Planta controle no mês de agosto (A), plantas tratada com extrato de mandioca em junho de 2013 (B), planta tratada com Dormex® em junho de 2013 (C), planta tratada com cianamida hidrogenada em junho de 2013 (D), planta tratada com extrato em julho de 2013 (E), planta tratada com Dormex® em julho de 2013 (F), planta tratada com cianamida hidrogenada em julho de 2013 (G). Fotos registradas em 11/08/13. Os resultados mostram que o extrato de mandioca (B e E) induziu a brotação da gemas dormentes de forma similar aos tratamentos com Dormex® (C e F) e cianamida hidrogenada P.A. (D e G)

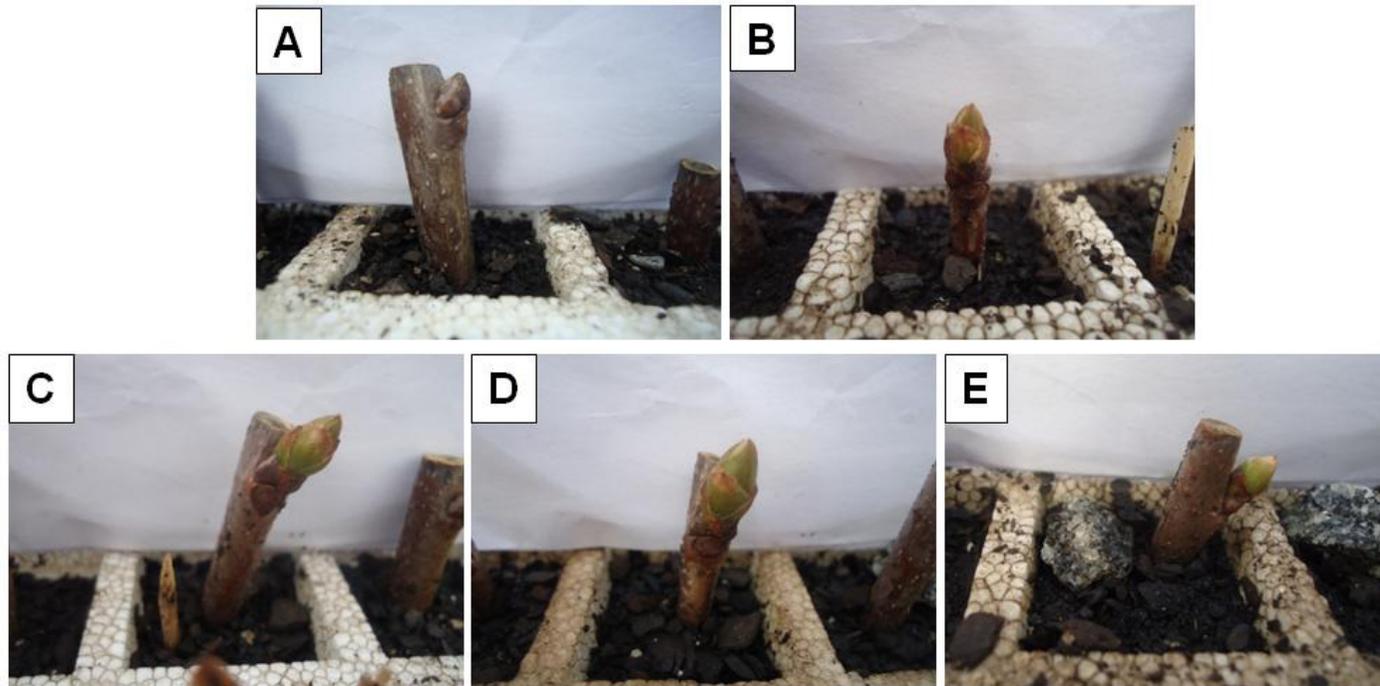


Figura 2: Controle (A), cianamida hidrogenada (B), extrato de mandioca 15gL^{-1} (C). extrato de mandioca 30gL^{-1} (D). extrato de mandioca 60gL^{-1} (E). Experimento realizado em casa de vegetação entre junho e julho de 2014, Fotos registradas em 02/07/2014. Estes experimentos foram realizados em casa de vegetação a fim de testar diferentes doses do extrato foliar de mandioca, os ramos foram coletados no campo e cortados em mini-estacas contendo de uma a duas gemas como. Observou que no controle as gemas permaneceram dormentes (A), no tratamento com cianamida hidrogenada houve a promoção da quebra da dormência (B) e as doses do extrato foliar de mandioca testadas também promoveram a quebra de dormência (C, D e E).

Na Figura 3 é apresentado o percentual de gemas brotadas ao longo de um período no ano de 2013, tanto o Dormex® quanto a cianamida hidrogenada apresentaram a mesma taxa de brotação (linhas vermelha e verde, respectivamente), o extrato de mandioca apresentou a taxa de brotação intermediária entre e o controle e os produtos já conhecidos por quebrar a dormência. Até o último dia de avaliação o controle apresentou 7% de brotação, o extrato de mandioca 26%, o dormex e a cianamida cerca de 30%.

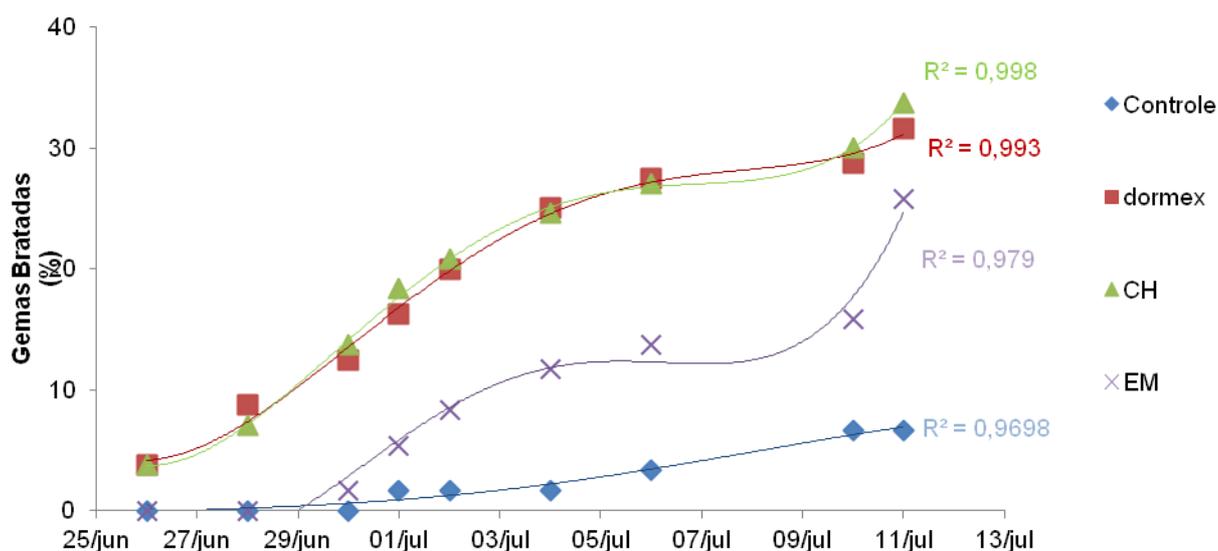


Figura 3: Taxa de brotação de gemas dormentes. Controle (linha azul), Dormex® 1,5% (linha vermelha), cianamida hidrogenada (CH, linha verde), extrato de mandioca 30g l⁻¹ (EM, linha lilás). Experimento realizado em casa de vegetação entre junho e julho de 2013. Neste experimento, no último dia de avaliação o controle teve uma taxa de brotação de 7%, sendo que o extrato foliar de mandioca, o Dormex® e a cianamida hidrogenada a taxa de brotação ficou em torno de 30%.

No ano de 2014 foi realizado novamente o experimento de casa de vegetação (Figura 4). Neste caso foram testadas diferentes doses do extrato de mandioca, que não apresentaram diferenças, contudo a taxa de brotação foi superior a cianamida hidrogenada e ao controle. Observa-se, também, que o início da brotação das gemas tratadas com 30 e 60g L⁻¹ foi antecipada em 1 dia em relação ao tratamento com extrato de mandioca 15g L⁻¹ e cianamida hidrogenada, e em relação ao controle, a antecipação foi de 2 dias.

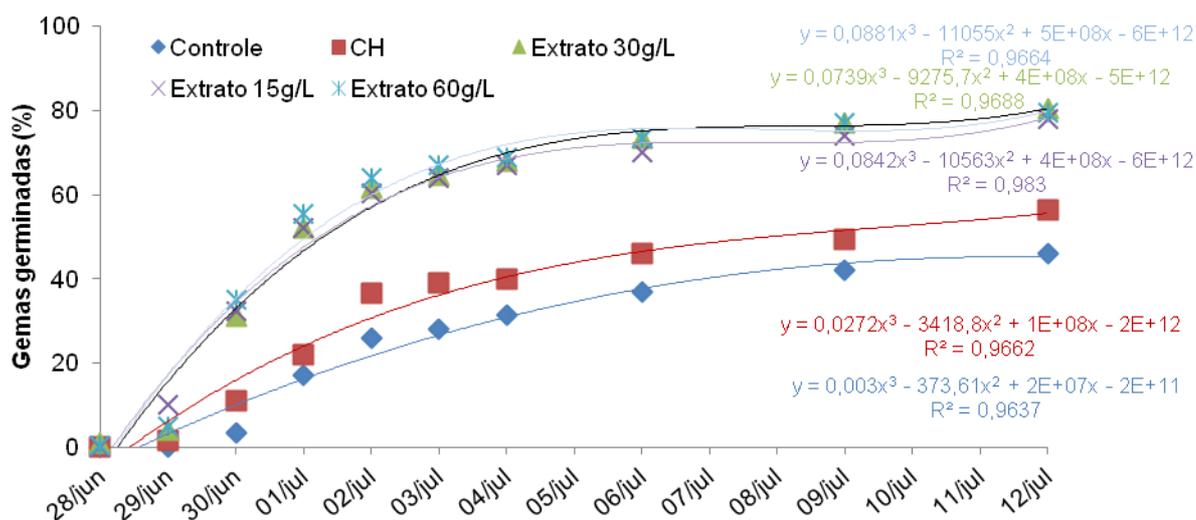


Figura 4: Taxa de brotação de gemas dormentes. Controle (linha azul), cianamida hidrogenada (CH, linha vermelha), extrato de mandioca 15g/L^{-1} (EM, linha lilás). extrato de mandioca 30g/L^{-1} (EM, linha verde). extrato de mandioca 60g/L^{-1} (EM, linha azul claro). Experimento realizado em casa de vegetação entre junho e julho de 2014. Foi observado que não houve diferença na brotação das gemas tratadas com as diferentes doses do extrato foliar de mandioca. Contudo, neste caso, o brotação das gemas tratadas com o extrato foliar de mandioca foi superior ao tratamento com cianamida hidrogenada.

Na Figura 5, foi avaliado o número de brotos por dia. Observa-se que as três diferentes doses do extrato de mandioca e o tratamento com cianamida hidrogenada apresentaram o pico de brotação no mesmo dia. Contudo, os tratamentos com o extrato de mandioca foi superior ao tratamento com cianamida, enquanto que o controle apresentou o pico de brotação 2 dias após os demais tratamentos.

Atividade das P^+ -ATPases, V-ATPase e H^+ -PPase

Foram realizados os ensaios bioquímicos das gemas 48 horas após serem submetidas aos tratamentos em campo. A seguir são apresentados os resultados.

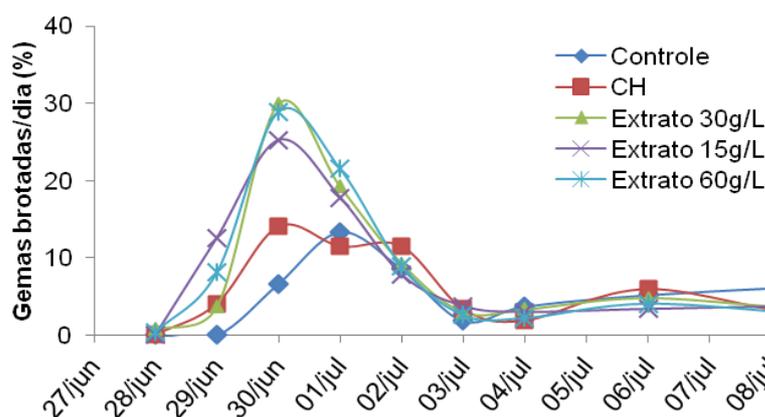


Figura 5: Taxa diária de brotação de gemas dormentes. Controle (linha azul), cianamida hidrogenada (CH, linha vermelha), extrato de mandioca 15gL⁻¹(EM, linha lilás). extrato de mandioca 30gL⁻¹(EM, linha verde), extrato de mandioca 60gL⁻¹(EM, linha azul claro). Experimento realizado em casa de vegetação entre junho e julho de 2014. As diferentes doses do extrato de mandioca e o tratamento com cianamida hidrogenada apresentaram o pico de brotação no mesmo dia, contudo, os tratamentos com o extrato de mandioca foi superior ao tratamento com cianamida, enquanto o controle apresentou o pico de brotação 2 dias após os demais tratamentos.

A atividade de hidrólise da P-ATPase foi alterada com os tratamentos com Dormex® e extrato de mandioca (Figura 6A), sendo que o tratamento com extrato de mandioca aumentou cerca de 400%, o tratamento com Dormex® 230% e o tratamento com cianamida hidrogenada foi estatisticamente igual ao tratamento com Dormex® (Figura 6A).

Na Figura 6B observa-se o aumento da atividade de hidrólise da H⁺-PPase nas gemas em todos os tratamentos em relação ao controle, sendo que o aumento foi maior no tratamento com cianamida hidrogenada com 470% em relação ao controle, enquanto que o tratamento com Dormex® o aumento foi de 152% e o tratamento com extrato de mandioca foi de 223%.

A atividade de hidrólise da V-ATPase só foi alterada nos tratamentos com Dormex® com aumento de 124% e redução de 84% para o tratamento com cianamida hidrogenada (Figura 6C).

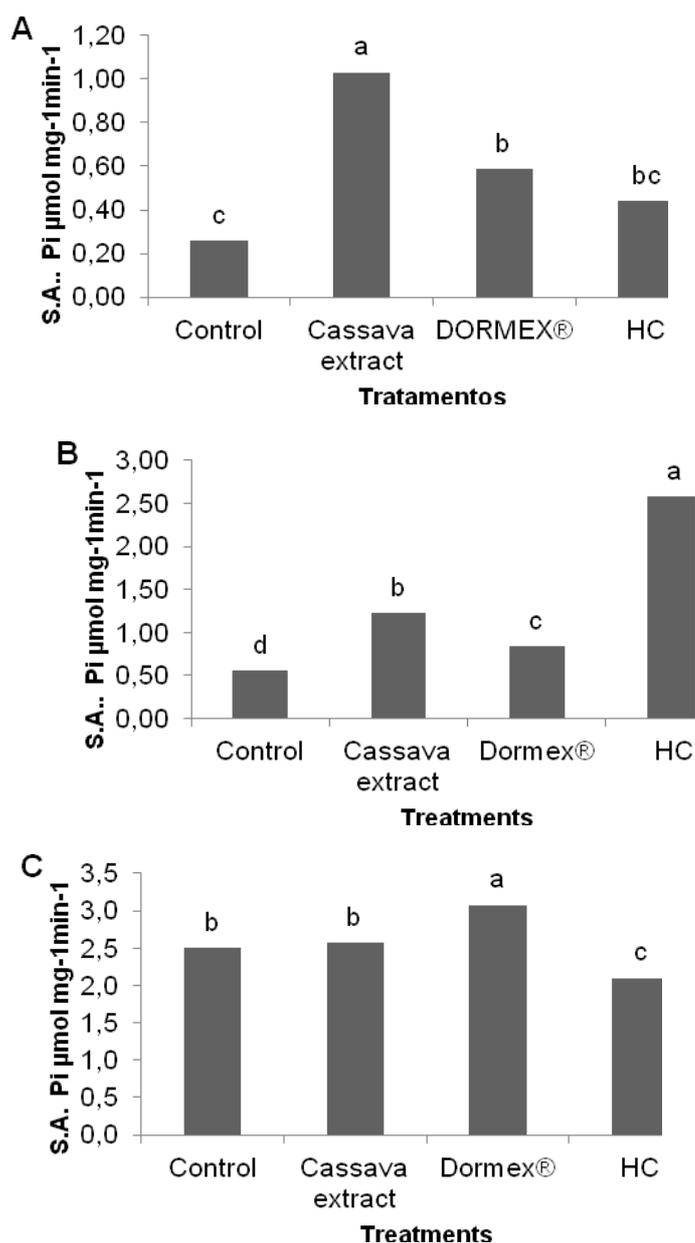


Figura 6: Atividade específica P-ATPase (A), H^+ -PPase (B) e V-ATPase, 48h após os tratamentos. Controle, Dormex® 1,5%, cianamida hidrogenada 1,5% (CH) e extrato de mandioca 30gL^{-1} (EM). A atividade de hidrólise da P-ATPase aumentou cerca 230% nos tratamentos com Dormex® e cianamida hidrogenada, 400% extrato foliar de mandioca (A). Atividade da H^+ -PPase aumentou em todos os tratamentos em relação ao controle, sendo que o aumento foi maior no tratamento com cianamida hidrogenada com 470% em relação ao controle, enquanto que o tratamento com Dormex® o aumento foi de 152% e o tratamento com extrato de mandioca foi de 223% (B), enquanto a V-ATPase só foi alterada nos tratamentos com Dormex® com aumento de 124% e redução de 84% para o tratamento com cianamida hidrogenada (C).

DISCUSSÃO

A entrada da dormência é uma estratégia de sobrevivência durante o inverno de muitas plantas de clima temperado. A saída da dormência ocorre de forma natural em regiões de clima temperado e subtropical, sendo necessário cerca de 500 h de frio de 4 a 7°C (Faquim et al., 2007). Contudo, quando o objetivo é um plantio comercial, o produtor utiliza estratégias para adiantar e/ou homogeneizar a brotação das gemas dormentes e são utilizados alguns produtos comerciais como, por exemplo, o Dormex®, que tem a cianamida hidrogenada como princípio ativo. Apesar do amplo uso destes produtos ainda não se conhece o mecanismo de ação dos mesmos nem o mecanismo da quebra de dormência.

Neste trabalho testou-se o produto comercial Dormex®, cianamida hidrogenada P.A. (princípio ativo do Dormex®) e o extrato de mandioca com o intuito de induzir a quebra da dormência do caquizeiro. O extrato de mandioca foi testado pelo fato de a planta de mandioca apresentar em sua composição compostos cianogênicos. Os dados revelam que o extrato de mandioca foi capaz de induzir a quebra da dormência de forma eficaz e pode ser um produto alternativo para quebrar a dormência.

O mecanismo de quebra da dormência destas plantas ainda não foi totalmente elucidado. Os dados apresentados neste trabalho apontam que os produtos já utilizados para promover a quebra de dormência alteram as bombas de H⁺ e que o extrato de mandioca também promove a quebra de dormência alterando também a atividade hidrolítica destas bombas.

O aumento da atividade da P-ATPase foi observado 48 h após o tratamento com os produtos aplicados, sendo que o aumento mais pronunciado foi tratamento com o extrato de mandioca (Figura 6A), entretanto tratamento apresentou menor taxa de brotação das gemas em relação aos tratamentos com cianamida hidrogenada e Dormex® (Figura 3).

Em relação à atividade da H⁺-PPase, foi estimulada em todos os tratamentos, sendo maior no tratamento com a cianamida hidrogenada (Figura 6B). Enquanto que a V-ATPase foi pouco alterada com aumento no tratamento com Dormex® e com a redução no tratamento com cianamida hidrogenada (Figura 6C).

O processo de quebra de dormência está relacionado com a atividade das bombas de H⁺, pois o tratamento que ativou mais atividade da P-ATPase foi o extrato de mandioca, cerca de 4 vezes em relação ao controle, ocorreu o atraso da brotação no campo, enquanto que a atividade nos tratamentos com Dormex® e cianamida hidrogenada aumentou aproximadamente 2 vezes quando comparada com o controle (Figura 6A). A H⁺-PPase também aumentou a atividade em todos os tratamentos em relação ao controle (Figura 6B), enquanto que a V-ATPase sofreu poucas alterações (Figura 6C).

Os dados coletados no ano de 2013 mostram que o extrato de mandioca apesar de apresentar menos taxa de brotação das gemas também é eficiente na quebra da dormência (Figuras 1B e E). Quando os experimentos foram realizados no ano de 2014, com o propósito de verificar o efeito da dose do extrato de mandioca, os resultados mostram que o extrato de mandioca se tornou mais eficiente em todas as doses testadas. Outro fato observado foi que, o início da brotação das gemas tratadas com o extrato de mandioca e com a cianamida hidrogenada ocorre de forma simultânea, mostrando que o extrato de mandioca apresenta o mesmo efeito que a cianamida hidrogenada.

Além dos testes feitos em casa de vegetação, os testes realizados em campo comprovam que o extrato de mandioca quebra a dormência do caquizeiro com eficiência, apesar da brotação ocorrer com um pouco mais de atraso em relação aos tratamentos com Dormex® e cianamida hidrogenada.

A cianamida hidrogenada é rapidamente absorvida e metabolizada (Goldback et al., 1988) e causa diminuição da atividade da catalase, sem modificar a da peroxidase (Shulman et al., 1986), aumentando a concentração de

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tecidos das gemas. Tem sido postulado que este aumento de H_2O_2 pode ser responsável pela ativação do ciclo das pentoses, culminando com a indução da quebra de dormência das gemas (Pérez et al., 2009; Omran, 1980). Foi também observado que a cianamida hidrogenada induz uma rápida mudança no conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), em gemas de pessegueiro (Siller-Cepeda et al., 1992; Or et al., 2000; Pérez et al., 2009;). Uma diminuição da GSH foi observada dentro do período de 12 horas após a aplicação de cianamida hidrogenada, sugerindo que a GSH consumida nos tecidos pode ter sido utilizada na desintoxicação do H_2O_2 acumulado, quando a atividade da catalase foi inibida (Amberger, 1984). A aplicação de cianamida hidrogenada em gemas de videira resulta na redução da atividade da catalase, similar ao que ocorre em videiras mantidas à temperatura de 4 °C (Botelho et al., 2002).

Foi postulado previamente que a cianamida hidrogenada não afetaria diretamente a respiração, mas poderia levar a distúrbios respiratórios via indução de estresse oxidativo pela inativação da catalase (Or et al., 2000). Em leveduras, a exposição a H_2O_2 leva à repressão de enzimas metabólicas envolvidas na glicólise e no Ciclo de Krebs logo após a exposição (Godon, 1998). Foi observado em uva que a aplicação de cianamida hidrogenada levou a indução simultânea e notável no nível de transcrição das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (Or et al., 2000), as quais, em condições normais, se expressam em baixos níveis nas células de plantas, mas são induzidas por distúrbios respiratórios (Perata e Alpi., 1993). Pérez e colaboradores (2009) relataram um efeito direto da cianamida, inibindo parcialmente o consumo de O_2 mitocondrial. Todavia, foi necessário expor as mitocôndrias a concentrações tão elevadas quanto 100 mM de cianamida, cerca de 100 vezes maior do que a concentração de azida (1 mM), para se verificar um bloqueio parcial da respiração mitocondrial (Pérez et al., 2009). Nenhum dado conclusivo pode ser obtido das análises feitas neste estudo sobre os efeitos da cianamida sobre a oxidase alternativa mitocondrial (AOX).

Por outro lado, a geração de espécies reativas de oxigênio, especialmente H_2O_2 , durante o estresse, tem sido proposta como parte da cascata de sinalização que conduz à resposta da planta (Foyer et al., 1997; Anderson, 1998). Or et al., (2000) mostraram também que a expressão de uma *proteína quinase SNF-like* é induzida pela aplicação cianamida hidrogenada.

Esses autores sugerem que as proteínas quinases da família SNF-like podem funcionar como pseudoreceptores, e responder a diferentes tipos de estresse (Hardie, 1994). As proteínas quinases SNF1 e 4 de *Saccharomyces cerevisiae* são ativadas sob condições de privação de glicose e são necessárias para a desrepressão de genes envolvidos no catabolismo fermentativo de carboidratos (Celenza e Carlson, 1986; 1989), incluindo invertases intracelulares, insensíveis a depleção de sacarose (Carlson e Botstein, 1982). Em animais, essas quinases estão envolvidas na regulação do metabolismo do ácido graxo sendo ativado por um aumento no nível de AMP, que ocorre em resposta a estresses energéticos (Carling et al., 1994; Hardie, 1994; Gao et al., 1995). Tem sido relatado que em plantas, algumas quinases SNF-like são reguladas por estresses que promovem depleção energética, como o que ocorre sob estresse hídrico e baixos níveis de ABA (Anderberg e Walker-Simmons, 1992), e privação de nutrientes (Sano e Youssefian, 1994).

Vários agentes de quebra de dormência podem afetar a respiração diretamente por inibição da fosforilação oxidativa ou indiretamente por danos mitocondriais como os provocados pela exposição ao frio intenso. Esses agentes, de fato, induzem o aumento da relação AMP/ATP nas células das gemas, um primeiro sinal de estresse energético, levando a cascatas de transdução de sinais nas quais as *SNF*-quinases podem servir como receptores comuns de agentes sinalizadores de depleção energética (Or et al., 2000).

CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato de folhas de mandioca quebra a dormência de gemas vegetativas de caquizeiro de forma similar ao produto comercial Dormex® e ao seu princípio ativo, cianamida hidrogenada. Todos os produtos utilizados, extrato de mandioca, Dormex® e cianamida hidrogenada induziram a atividade da P-ATPase e a H⁺-PPase, indicando assim que estas enzimas têm um papel fundamental no processo de quebra de dormência

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amberger, A. (1984) Uptake and metabolism of hydrogen cyanamide in plants. *In*: R.J. Weaver (Ed.) *Proceeding of Bud Dormancy of Grapevine: Potential and Practical Uses of Hydrogen Cyanamide on Grapevine*, 20 August 1984, University of California, Davis, CA, pp. 5–10.
- Anderberg, R.J.; Walker-Simmons, M.K. (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Plant Biology*, Vol. 89, pp. 10183-10187.
- Anderson, M. D.; Chen, Z.; Klessig, D. F. (1998) Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of pr-1 gene expression *Phytochemistry*, Vol. 47~ No. 4, pp. 555-566.
- Arellano, L.S. Uso de cianamida hidrogenada em plantas de folhas caducas no Chile (1991) *In*: *WORKSHOP-DORMEX*, Vitória. Resumos. Vitória: BASF/SKW, 15p.
- Botelho, R. V., Pires, E. J. P., Terra, M. M. (2002) Brotação e produtividade de videiras da cultivar centennial seedless (*Vitis vinifera* L.) tratadas com cianamida hidrogenada na região noroeste do estado de São Paulo. *Revista Brasileira Fruticultura, Jaboticabal - SP*, v. 24, n. 3, p. 611-614.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Carling, D.; Aguan, K.; Woods, A.; Verhoevens, A.J.M.; Berim, R.K.; Brennan, C.H.; Sidebottom, C.; Davison, M.D.; Scott, J. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinases homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 15, pp. 11442-11448.
- Carlson, M.; Botstein, D. (1982) Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, Vol. 28, 145-154.
- Celenza, J.L.; Carlson, M. (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*. 12;233(4769):1175-80.
- Celenza, J.L.; Carlson, M. (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Molecular and Cellular Biology*, p. 5034-5044 Vol. 9, No. 11.
- De Michelis, M. I., Spanswick, R. M. (1986) H⁺-pumping drive by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology* 81:542-547.
- Faquim, R.; Silva, I. D.; Carvalho, R. I. N. (2007) Necessidade de frio para quebra de dormência de gemas de caqui 'Fuyu'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n.3, p. 438-444.
- Fiske, C.F., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375.
- Foyer, C.H., Lopes-Delgado, H., Dat, J.F. and Scott, I.M. (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.* 100: 1554–1561.
- Gao, G.; Widmer, J.; Stapleton, D.; The, T.; Cox, T.; Kemp, B. E.; Witters, L. A. (1995) Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochimica et Biophysica Acta* 1266, 73-82.
- Godon, C.; Lagniel, G.; Lee, J.; Buhler, J.M.; Kieffer, S.; Perrot, M.; Boucherie, H.; Toledano, M.B.; Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(35):22480-9.
- Goldback, H., Thaler, C., Wünsch, A. (1988) Decomposition of ¹⁴C-labelled cyanamide in *Vitis vinifera* cuttings. *Journal of Plant Physiology*, v.133, p.299-303,

- Lang, G.A.; Early, J.D.; Martín, G.C.; Darnell, R.L. (1987) Endo, para-and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*, Alexandria, v.22, p.371-378.
- Mann, S.; Singh, H.; Sandu, A. S.; Grewal, G. P. S. (1994) Effect of cyanamide on bud burst, flowering and fruit maturity of Baggugosha pear. *Acta Horticulturae*, v.367, p.214-223.
- Marodin, G.A.B.; Sartori, I.A.; Guerra, D.S. (2002) Efeito da aplicação de cianamida hidrogenada e óleo mineral na quebra de dormência e produção do pessegueiro – ‘Flamecrest’. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal – SP, v. 24, n. 2, p. 426-430.
- Mizobutisi, G.P.; Bruckner, C. H.; Salomão, L.C.C.; Ribeiro, R.A.; Motta, W.F. (2003) Efeito da aplicação de cianamida hidrogenada e de óleo mineral em caquizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal – SP, v. 25, nº 1, p. 89-92.
- Oliveira Filho, P. R. C.; Carvalho, R. I. N. (2003) Dinâmica da dormência em gemas de pessegueiro das variedades Eldorado e Ágata. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 1, n. 3, p. 41-46.
- Or, E.; Viložny, I.; Eyal, Y.; Ogródovitch, A. (2000) The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Molecular Biology* 43: 483–494.
- Perata, P.; Alpi, A. (1993) Plant responses to anaerobiosis. *Plant Science* 93, 1-17.
- Pérez, F. J. Vergara, R.; Or, E. (2009) On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regul*, 59:145–152.
- Petri, J. L. et al. (1996) Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado. Florianópolis: *Epagri*, (Boletim Técnico, 75).
- Rayle, D. L. Cleand, R (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271-1274.
- Sano, H.; Youssefian, S. (1994) Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins. *Plant Biology*, vol. 91, pp. 2582-2586.
- Taiz, L. e Zeiger, E. (2009) *Fisiologia Vegetal*, 4ªed – Porto Alegre, Artmet.