

Adaptação de método para a extração de proteínas de sementes de cerejeira (*Amburana cearensis* (Fr.All.) A.C.Smith)

Antonietta Nassif Salomão¹

Luzia Helena Corrêa Lima²

Marco Antonio Ferreira³

Introdução

Os ajustes metabólicos que conferem à semente ortodoxa a tolerância extrema e rápida à perda de água durante seu desenvolvimento (essa perda em grãos atinge níveis de 50-60% (Ellis et al., 1987)), têm, sobretudo, uma função protetora contra os efeitos deletérios da desidratação, em diferentes componentes celulares (membranas, citoplasma e proteínas). Tal função protetora é atribuída, basicamente, aos processos bioquímicos resumidos a seguir:

1. O acúmulo de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) e açúcares solúveis (sacarose) que protegem a integridade estrutural das membranas, prevenindo sua fusão e suas fases de transição e separação durante a desidratação, e provendo as interações hidrofílicas necessárias à estabilidade das proteínas e das atividades enzimáticas. O efeito protetor dos açúcares estaria também associado à formação de uma fase de vitrificação citoplasmática, evitando os danos causados pela cristalização na ausência de água (Koster & Leopold, 1988; Williams & Leopold, 1989; Chen & Burris, 1990; Blackman et al., 1991; Ooms et al., 1993; Sun et al., 1993; Sun et al., 1994).

2. A habilidade de prevenir, tolerar e reparar o ataque de radicais livres durante a desidratação (Leprince et al., 1993).

3. A síntese de proteínas específicas, com caráter hidrofílico, que manteriam a integridade estrutural dos componentes intracelulares durante a perda de água, por meio do "seqüestro" de íons e da proteção de outras proteínas ou membranas. Essas proteínas atuariam, indiretamente, no controle das características da água de ligação da semente (Bartels et al., 1988; Dure et al., 1989; Blackman et al., 1991; Bewley & Oliver, 1992; Bray, 1993; Leprince et al., 1993).

Nas fases posteriores ao acúmulo de reservas é detectado no embrião um conjunto de mRNAs que codificam proteínas específicas, as quais diferem daquelas de armazenamento (Skriver & Mundy, 1990). Essas proteínas são denominadas "late embryonic abundant proteins" (LEA), "maturation proteins", "dehydrin-like proteins" (Kermode, 1990; Farrant et al., 1992). Os mais altos níveis de expressão dos mRNAs de genes das proteínas LEA ocorrem antes da fase final de dessecação do embrião

¹ Eng^a. Florestal, M.Sc., Pesquisadora. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: antoniet@cenargen.embrapa.br

² Bióloga, PhD, Pesquisadora. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: luzia@cenargen.embrapa.br

³ Químico, Bs, Pesquisador. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: mantonio@cenargen.embrapa.br

(Kermode, 1990; Espelund et al., 1992). Os mRNA's transcritos, cuja regulação parece ser sobretudo transcricional, onde o ABA (ácido abscísico) desempenha o principal papel. Preservados na semente quiescente, desaparecem rapidamente nas primeiras horas de embebição durante a germinação (Goldberg et al., 1989; Kermode, 1990; Almoguera & Jordano, 1992; Espelund et al., 1992; Leprince et al., 1993). Alguns aspectos relativos à síntese e à função dessas proteínas não estão elucidados. Não se sabe ao certo se o declínio da síntese das proteínas é uma consequência da desidratação *per se*, ou se está geneticamente programado, constituindo-se, assim, um evento inerente e necessário ao início do processo de maturação da semente (Berjak et al., 1984). Se, por um lado, essas proteínas são necessárias para assegurar a sobrevivência do embrião face à desidratação, por outro lado, elas não parecem ser essenciais à germinação. Diferentes subconjuntos ou grupos das proteínas LEA têm sido identificados, segundo a especificidade e/ou sequência homóloga de aminoácidos (Farrant et al., 1992; Bray, 1990; Leprince et al., 1993). A família de genes do primeiro grupo (LEA) está relacionada à desidratação celular e sua síntese coincide com a aquisição da tolerância ao dessecação e/ou com o dessecação. A família de genes do segundo grupo (heat shock proteins - HSP; cold regulation - COR) está relacionada à termotolerância. A terceira família de genes (RAB) está relacionada ao estresse hídrico (dehydrin) e à indução pelo ABA.

As proteínas LEA são fortemente hidrofílicas, resistentes à desnaturação, estáveis, solúveis a altas temperaturas, não têm um estado termodinâmico preferencial. Apresentam estrutura secundária α - hélice e mantêm conservada, através das espécies, sequência homóloga de aminoácidos. Devido a essas características, tem sido sugerido que elas podem atuar como osmo-protetoras ou reparadoras de danos de desidratação (Close et al., 1989; Dure et al., 1989; Jacobsen & Shaw, 1989; Almoguera & Jordano, 1992; Bradford & Chandler, 1992; Espelund et al., 1992; Kovach et al., 1992; Bewley & Black, 1994).

Cerejeira (*Amburana cearensis*, Leguminosae Papilionoideae) é uma espécie arbórea de múltiplos usos (Usher, 1974), possui características xéricas e ocorre em matas mesofíticas dos biomas Cerrado e Caatinga (Barbosa, 1983). Devido à sua especificidade ecológica, a espécie pode ser utilizada para estudos elucidativos sobre a atuação de proteínas LEA. Assim, esse trabalho teve como objetivo adaptar um protocolo de extração de proteínas para sementes de cerejeira, visando futuros estudos de detecção de proteínas LEA, nessa espécie.

Material e métodos

Material

A escolha dos tampões de extração de proteínas baseou-se nos resultados obtidos para a detecção de proteínas LEA em sementes de *Avicennia marina* (Farrant et al., 1992) e de soja (Blackman et al., 1991). O tampão que permitisse a melhor resolução das bandas seria definido, a priori, como o mais eficiente para a extração das proteínas de cerejeira.

As sementes utilizadas procederam de quatro localidades distintas, conforme identificação pelo número da amostra em caderneta de campo dos coletores José Alves da Silva, Antonieta Nassif Salomão, Aécio Amaral dos Santos e Sérgio Eustáquio de Noronha:

210: sementes compradas na feira de Barreiras, BA; conteúdo de umidade inicial de 7,0%;

276: sementes coletadas em Guanambi, BA; conteúdo de umidade inicial de 6,5%;

285: sementes coletadas em Porteirinha, MG; conteúdo de umidade inicial de 7,8%;

322: sementes coletadas em Coronel Murta, MG; conteúdo de umidade inicial de 7,3%.

Tampões de extração de proteínas

Tampão 1 *Avicennia marina* (Farrant et al., 1992):

Trizma base	50mM
Sacarose	0,7M
EDTA	50mM
KCl	0,1M
β MEOH	2%
PVPP	1g
Thiourea	10mM
pH7,0	

Tampão 2 Soja (Blackman et al., 1991):

Trizma base	50mM
NaCl	500mM
EDTA	50mM
MgCl ₂	5mM
pH	7,5

Extração de proteínas de sementes inteiras, cotilédones e eixos embrionários

Foram extraídas proteínas de sementes inteiras, cotilédones e eixos embrionários de 276, testando-se os

dois tampões (*Avicennia marina* e soja). Para as demais procedências fez-se a extração de proteínas apenas das sementes inteiras com o tampão de *Avicennia marina*.

A quantidade de material /procedência triturado em nitrogênio líquido foi de: 276: 1,2526g (semente), 1g (cotilédono) e 0,25g (eixos embrionários); 210: 1,1588g (semente); 285: 1,4032g (semente); 322: 1,1722g (semente).

Acrescentaram-se 5ml (semente e cotilédono) e 1,5ml (eixos embrionários) de tampão *Avicennia marina* ou soja. Para sementes inteiras de 276 foi feita a extração de proteína após desidratação das sementes em sílica-gel à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 0 (testemunha), 72 e 144h e desidratação seguida de embebição em papel-toalha por 24h à temperatura de incubação de 25°C . Para a testemunha (0h de desidratação) fez-se a extração de proteínas após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18 e 24h de embebição, nas condições descritas anteriormente. Os tubos foram colocados na geladeira por 2h, sendo agitados manualmente a cada 15 min. Os extratos foram centrifugados a 4°C , 13000rpm / 20min (centrífuga refrigerada Sigma 3K10, rotor N12160). Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e os extratos foram armazenados com 150µl de glicerol a -20°C .

Eletroforese

Soluções estoque:

Solução M	Trizma HCl 0,5M pH 6,8	SDS 0,4%
Solução N	acrilamida 29,2g/100ml	bis-acrilamida 0,8g/100ml
Solução L	Trizma HCl 1,5M pH 8,4	SDS 0,4%
Tampão	Trizma HCl 0,5M pH 6,8	

Tampão de corrida:

Trizma HCl	3,0g
Glicina	14,3g
SDS	1,0g
pH	8,4

Gel separador desnaturante em gradiente de densidade de 10% a 18%

Soluções	10%	18%
Solução L	3ml	3ml
Solução N	4ml	7,2ml
H ₂ O	5ml	450µl
Glicerol	-	1,35µl
PA 10%	25µl	25µl
TEMED	10µl	10µl
Volume final	12ml	12ml

Solução gel concentrador (4,7%):

Solução M	2ml
Solução N	1,25ml
H ₂ O	4,75ml
PA 10%	50µl

TEMED	5µl
Volume final	8ml

Tampão de amostra:

Trizma HCl 0,5M	12,5ml
SDS	2%
βMEOH	2%
Sacarose	12%
Azul de bromofenol	0,02%
Volume final	100ml
pH	6,8

Preparação da amostra para o gel de poliacrilamida:

Extrato protéico	10µl
Tampão de amostra	10µl

Solução corante do gel:

Metanol	45%
Ácido acético	10%
H ₂ O	45%
Coomassie blue	0,25%
Volume final	100ml

Solução descorante do gel:

Metanol	45%
Ácido acético	10%
H ₂ O	45%
Volume final	1l

Resultados e Discussão

O tampão 1 *Avicennia marina* foi mais eficaz para a extração de proteínas de cerejeira, uma vez que permitiu melhor resolução das bandas no gel. Em géis preliminares não foi possível obter uma resolução satisfatória, quando da utilização do tampão 2 soja. Na Fig. 1 são apresentados os resultados obtidos com o tampão 2 (bandas 1 e 2) e com o tampão 1 (bandas 3 e 4) para cotilédones e eixos embrionários de sementes da procedência 276. Esses resultados reforçaram a escolha do tampão 1 de *Avicennia marina*, para o prosseguimento do experimento, uma vez que se obteve maior nitidez e resolução no perfil eletroforético. A eficiência do tampão 1 deve-se, possivelmente, à presença do PVP (polivinilpirolidona) que, por ser um inibidor de protease, contribuiu para que não houvesse degradação das proteínas. As sementes de todas as procedências analisadas apresentaram o mesmo padrão protéico, conforme observado nas bandas 5, 6, 7 e 8 da Fig. 1.

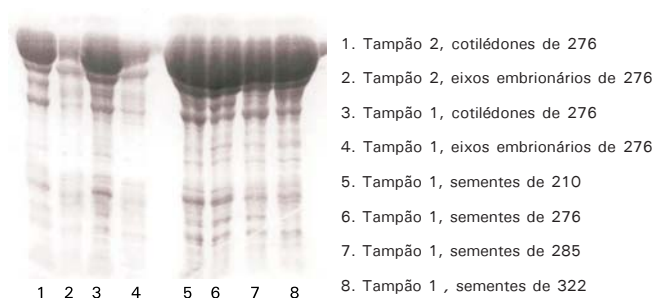


Fig. 1. Utilização de tampões de extração de proteínas (Tampão 1 *Avicenna marina*, Tampão 2 soja) de sementes, cotilédones e eixos embrionários de quatro procedências *Amburana cearensis*.

A velocidade de desidratação e absorção de água pela semente é determinada, dentre outros fatores, pelas características morfofoculares dos envoltórios da semente ou embrião. Sementes de cerejeira possuem tegumento semipermeável, o que torna os processos de perda e absorção de água mais lentos. Assim, para as sementes da procedência 276, tanto a desidratação quanto a embebição não resultaram em redução ou aumento pronunciado do conteúdo de umidade (Tabela 1). Dessa forma, a não- alteração na expressão de proteínas das sementes submetidas aos diferentes períodos de dessecamento e à subsequente embebição, foi, provavelmente, em função da semipermeabilidade do tegumento (Fig. 2). Outro fator que pode ter contribuído para que não fosse identificada a degradação protéica, nas bandas 2, 4 e 6 (Fig. 2), foi o período de embebição de 24h.

Tabela 1. Conteúdo de umidade de sementes 276 após diferentes períodos de desidratação e desidratação seguida de 24h de embebição

Tratamentos	Umidade (%)
0h de desidratação (testemunha)	6,5
Testemunha após 24h embebição	8,7
72h desidratação	5,6
72h desidratação após 24h embebição	7,9
144h desidratação	5,3
144h desidratação após 24h embebição	8,2

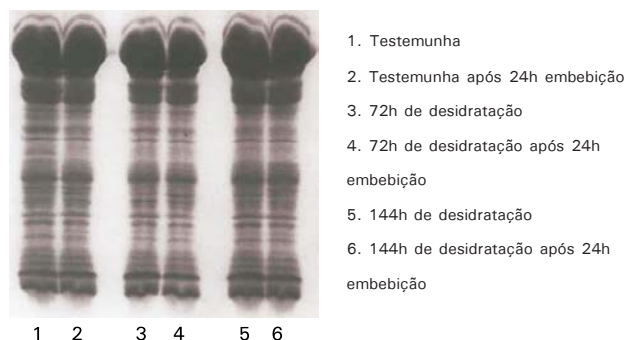


Fig. 2. Proteínas de sementes de *Amburana cearensis*, procedência 276, após diferentes períodos de desidratação e desidratação seguida de 24h de embebição.

Resultado similar, ou seja, a não mudança na expressão do padrão protéico, foi observado tanto para a testemunha (banda 1) quanto para as demais amostras após distintos períodos de embebição (bandas de 2 a 10), conforme apresentado na Fig. 3.

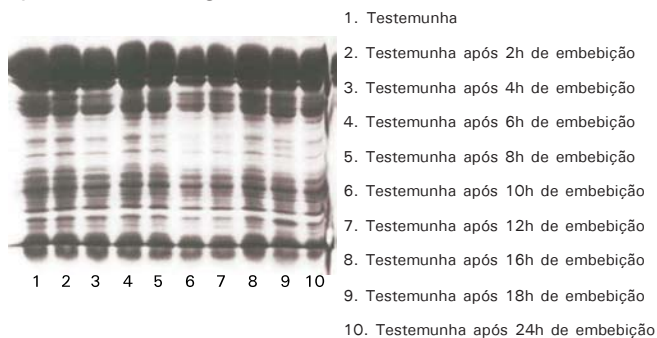


Fig. 3. Proteínas de sementes de *Amburana cearensis*; procedência 276, com 6,5% de umidade e após diferentes períodos de embebição

As etapas subsequentes dos estudos de proteínas LEAs em sementes de cerejeira serão: detecção e quantificação das proteínas LEAs; determinação do tempo de embebição requerido durante a germinação, para que ocorra a degradação dessas proteínas e avaliação da estabilidade dessas proteínas em bancos de sementes no campo. O método estabelecido nesse trabalho será utilizado para o cumprimento dessas etapas.

Referências Bibliograficas

ALMOGUERA, C.; JORDANO, J. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low molecular-weight heat-shock protein and LEA mRNAs. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht v. 19, p. 781-792, 1992.

BARBOSA, M. C. Alguns aspectos morfológicos da folha de *Amburana cearensis* (Fr.All.) A. C. Smith, ocorrente em áreas de agreste e caatinga do Nordeste. **Brasil Florestal**, Brasília, v. 53, p. 43-46, 1983.

BARTELS, D.; SINGH, M.; SALAMINI, F. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. **Planta**, New York, v. 175, p. 485-492, 1988.

BERJAK, P.; DINI, M.; PAMMENTER, N. W. Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 12, p. 365-384, 1984.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. p. 117-145.

BEWLEY, J. D.; OLIVER, M. J. Desiccation tolerance in vegetative plant tissue and seeds: protein synthesis in relation to desiccation and potential role for protection and repair mechanisms. In: OSMOND, C. B.; SOMERO, G.; BOLIS, C. L. (Ed). **Water and life**. Berlim: Springer-Verloz, 1992. p. 141-160.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 96, p. 868-874, 1991.

BRADFORD, K. J.; CHANDLER, P. M. Expression of "dehydrin-like" proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 99, p. 488-494, 1992.

BRAY, E. A. Drought-stress-induced polypeptide accumulation in tomato leaves. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, UK, v. 13, p. 531-538, 1990.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

CHEN; Y.; BURRIS, J. S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behaviour in maturing maize seed. **Crop Science**, Madison, WI, v. 30, p. 971-975, 1990.

CLOSE, T. J.; KORTT, A. A.; CHANDLER, P. M. A cDNA-based comparison of dehydration induced proteins (dehydrins) in barley and corn. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 13, p. 95-108, 1989.

DURE, L. III.; CROUCH, M.; HARADA, J.; HO, T-H. D.; MUNDY, J.; QUATRANO, R.; THOMAS, T. ; ZUNG, Z. R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 12, p. 475-486, 1989.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. The development of desiccation tolerance and maximum seed quality during seed maturation of six grain legumes. **Annals of Botany**, London, v. 59, p. 23-29, 1987.

ESPELUND, M.; SAEBOE-LARSEN, S. HUGHES, D. W.; GALAU, G. A.; LARSEN, F.; JAKOBSEN, K. S. Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. **The Plant Journal**, v. 2, n. 2, p. 241-252, 1992.

FARRANT, J. M.; BERJACK, P.; PAMMENTER, N. W. Proteins in development and germination of a desiccation sensitive (recalcitrant) seed species. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 11, p. 257-265, 1992.

GOLDBERG, R. B.; BARKER, S. J.; PEREZ-GRAU, L. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. **Cell**, Cambridge, MA, v. 56, p. 149-160, 1989.

JACOBSEN, J.V.; SHAW, D.C. Heat-stable proteins and abscisic acid action in barley aleurone cells. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 91, p. 1520-1526, 1989.

KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Plant Sciences**, v. 9, n. 2, p. 155-195, 1990.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 88, p. 829-832, 1988.

KOVACH, D. A.; STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. Desiccation tolerance of *Zizania palustris* seeds: Temperature dependence, imbibitional damage and role of "dehydrin" proteins. In: INTERNACIONAL WORKSHOP ON SEED, 4., 1992. **Basic and applied aspects of seed biology : Proceedings**. Paris : ASFIS, 1992. v. 3. p. 851-856.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, UK, v. 3, p. 231-246, 1993.

OOMS, J. J. J.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; BARTELS, D.; KOORNNEEF, M.; KARSEN, C. M. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 102, p. 1185-1191, 1993.

SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. **Plant Cell**, Rockville, MD, v. 2, p. 503-512, 1990.

SUN, W. Q.; IRVING, T. C.; LEOPOLD, A. C. Sugars and lipids transitions in relation to seed desiccation tolerance. (Abstract #19). **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 102, p. 5, 1993.

SUN, W. Q.; IRVING, T. C.; LEOPOLD, A. C. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed

desiccation tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, p. 621-628, 1994.

USHER, G. **A dictionary of plants used by man**. London: Constable, 1974. 619 p.

WILLIAMS, R. J.; LEOPOLD, A. C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 89, p. 977-981, 1989.

Comunicado Técnico, 64

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 150 unidades

Comitê de publicações

Expediente

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Miraci de Arruda Câmara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
Marcos Rodrigues de Faria
Marta Aguiar Sabo Mendes
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro
Revisor Gramatical: Felisberto de Almeida
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Câmara Pontual
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Priscila Rocha Silveira
Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva