



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

ISOLAMENTO PARCIAL DE UMA CITOQUININA OXIDASE PURIFICADA DE
PLÂNTULAS DE *Ricinus communis* L, cultivar BRS Energia

TARCIANA OLIVEIRA GUEDES

CRATO-CE

2010

TARCIANA OLIVEIRA GUEDES

ISOLAMENTO PARCIAL DE UMA CITOQUININA OXIDASE PURIFICADA DE
PLÂNTULAS DE *Ricinus communis* L., cultivar BRS Energia

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do
Cariri – URCA, como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Beatriz Tupinambá Freitas

CRATO-CE

2010

GUEDES, Tarciana Oliveira

Isolamento parcial de uma citoquinina oxidase purificada de
plântulas de *Ricinus communis* L, cultivar BRS Energia

- Crato, 2010.

99 f.: il.

Orientador: Dra. Beatriz Tupinambá Freitas

Dissertação (Mestrado) - Universidade Regional do Cariri.
Departamento de Ciências Biológicas.

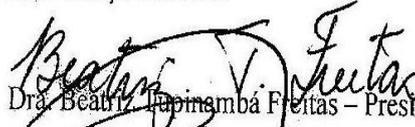
1. Citoquinina oxidase. 2. *Ricinus communis*. 3.
Purificação de proteínas.

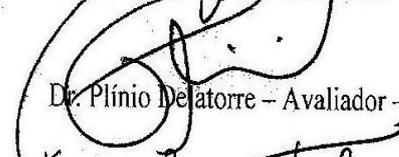
I. Título ...

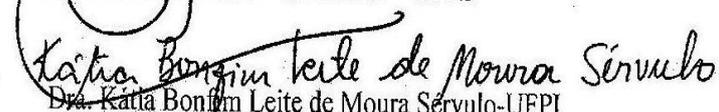
TARCIANA OLIVEIRA GUEDES

ISOLAMENTO PARCIAL DE UMA CITOQUININA OXIDASE PURIFICADA DE
PLÂNTULAS DE *Ricinus communis* L., cultivar BRS Energia

Submetida e Aprovada em 26/03/2010


Dra. Beatriz Tapinambá Freitas – Presidenta – Orientadora – UFS


Dr. Plínio Delatorre – Avaliador – UFPB


Dra. Kátia Bonfim Leite de Moura Servulo-UFPI


Maria Andaceli Rolim de Brito-Secretária

DEDICO

Aos meus pais, Davina Clares e Aliatas Guedes,

Pelo incentivo, amor e dedicação durante toda a minha vida

Aos meus padrinhos, Luiza Anilza e José Correia,

Parceiros na minha educação de forma irrestrita

A minha grande amiga e irmã, Débora Guedes

Pelo amor e cumplicidade.

OFEREÇO

In Memoriam: a meus avós,

Alvino Guedes, Amélia Guedes;

Manoel Clares e, Maria Hermínia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS a minha vida.

À minha família pelo estímulo incondicional durante a minha carreira profissional e intelectual, em especial aos meus pais Davina Clares Guedes e Aliatas Guedes, ao meu cunhado Jailson Charles dos Santos pelo acolhimento em sua residência durante todo o meu curso de mestrado e pelos conselhos valiosos de amigo e incentivo profissional.

À minha sobrinha e afilhada, Dávina Maria, que compartilha comigo a sua ternura e o doce sorriso durante essa jornada.

Ao meu noivo, José Joaquim da Silva por sua companhia maravilhosa, compreensão, amor e respeito à minha pesquisa.

À minha orientadora Dr^a Beatriz Tupinambá Freitas, pelo privilégio da sua dedicada orientação, pela sabedoria dos ensinamentos científicos com muita paciência, por ter um brilho e uma essência de raros, acompanhados de um grande profissionalismo e competência.

À Elizabeth Costa Marques, minha grande amiga, agradeço de coração pela presença constante durante toda a minha pesquisa, por compartilhar com muita humildade os seus valiosos conhecimentos científicos, a disponibilidade do seu tempo irrestrito, o carinho e preocupação.

À Universidade Regional do Cariri – URCA, por sua grande contribuição na minha vida intelectual desde o início da minha Graduação.

À Universidade Federal de Sergipe – UFS, pela grande parceria e colaboração na minha pesquisa. À Coordenação atual do curso de Pós –Graduação em Bioprospecção Molecular, Professora Dr^a. Sírléis Rodrigues Lacerda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo suporte financeiro.

Ao professor José Carlos Marques pela amizade, disponibilidade, sugestões fundamentais na parte experimental desse trabalho.

Ao Professor Dr. José Galberto Martins, pelo apoio da sua Coordenação de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular no decorrer do curso e a secretária Andecieli Maria.

À Embrapa Arroz e Algodão, em particular ao Professor Tarcisio Marcos de Sousa Gondim, pelo fornecimento das sementes para a realização chave da pesquisa.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Regional do Cariri, por ceder equipamentos para a realização do trabalho.

À Faculdade de Tecnologia Centec – FATEC Cariri, na pessoa do Diretor e Coordenadores dos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos e de Saneamento Ambiental, em especial Adriana Rejane Vitorino Menezes e Janneane do Nascimento, por terem disponibilizado espaço, equipamentos e reagentes necessário para realização deste trabalho.

Aos professores, Dr. Plínio Delatorre da Universidade Federal da Paraíba, Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva da Universidade Regional do Cariri, Dra. Kátia Leite Bonfim de Moura Sérvulo da Universidade Federal do Piauí, por aceitarem compor a banca de avaliadores da minha dissertação.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular que regularmente fui aluna.

À Felipe Gutierre Carvalho de Lima, o irmãozinho que ganhei no mestrado, dividindo a sua nobre educação e disposição na minha pesquisa, além do carinho e boa vontade, em ajudar e otimizar a nossa carreira profissional como mestre.

À amiga Ídila Maria de Araújo pelo suporte no mestrado, e contribuição no meu trabalho, pela gentileza das alegrias vivenciadas na sua conduta o meu, muito obrigado.

À Erika Carolina Fernandes, Gilvaneide Amaroto e Danilo Moraes pela grande contribuição e amizade para que concluísse essa pesquisa, por gestos imensos e demonstração fraterna.

À minha amiga Francinilda Araújo, por estar sempre de uma maneira especial e às vezes até distante torcendo pela minha felicidade e sucesso, ela sonha, chora e ri, vibra com minhas vitórias. SEI QUE SEMPRE POSSO CONTAR COM A SUA AMIZADE.

Aos amigos que de alguma maneira fortaleceram os meus sonhos, que desejaram que atingisse minhas metas, o meu gesto de agradecimento.

“Na folha que cai, na flor que brota, na onda que vai, no vento que sopra, Deus está, eu sei, Deus está. (...) Em tudo vejo o Teu Amor, em tudo vejo Tuas mãos e Te agradeço ó Criador, porque tudo o que existe, só existe porque Tu és Senhor(...)”

PAULO CÉSAR BARUK

RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é de ampla utilização industrial e de grande importância econômica, tanto na região Nordeste do Brasil como no mercado mundial. Apesar dos avanços em tecnologia de produção e de desenvolvimento de novas cultivares que minimizam efeitos negativos do ambiente sobre a produção e a qualidade, é essencial aumentar o entendimento das práticas culturais de colheita e pós-colheita e a forma como está afetam o processo fisiológico que determina a viabilidade e o vigor. O conhecimento dos efeitos fisiológicos da ação das citoquininas compreende um aspecto de aprimoramento dos métodos para a avaliação do desenvolvimento morfológico da mamona, além das rotas bioquímicas, no qual as citoquininas oxidases/desidrogenase (CKX) são enzimas responsáveis pela oxidação de citoquininas, substâncias que, com o auxílio de auxinas, ajudam a divisão celular das plantas. O objetivo deste estudo foi o isolamento parcial da citoquinina oxidase purificada de plântulas de *Ricinus communis* L, cultivar BRS Energia. Realizou-se com o estudo a caracterização da semente de mamona em seu desenvolvimento em diversos estádios durante 11 dias de germinação, evidenciando as melhores condições. O isolamento da CKX em raízes de plântulas de mamona foi realizado a partir da cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 e cromatografia de afinidade ConA-Agarose. A identificação da CKX foi feita a partir de sua atividade enzimática oxidante. O ensaio é baseado na formação de uma base de Schiff entre o produto da reação enzimática 3-metil-2-butenal e p-aminofenol. As sementes da cv. BRS Energia apresentaram em condições ambientais um maior desenvolvimento das plântulas. O perfil da cromatografia de exclusão molecular evidenciou dois picos, SI e SII, o primeiro sem atividade. O Pico SII apresentou atividade e em seguida aplicada em cromatografia de afinidade coluna de ConA-Agarose que possibilitou isolamento do pico CII com proteínas glicosiladas e/ou com outros resíduos glicídicos. A purificação parcial do pico CII na coluna de ConA-Agarose foi eficiente e apresentou atividade enzimática para CKX.

Palavras-chave: *Ricinus communis* L., proteína, citoquinina oxidase.

ABSTRACT

The castor bean (*Ricinus communis* L.) is widely used Industrial and large economic importance, both in the Northeast of Brazil as the world market. Despite advances in production technology and develop new cultivars that minimize the negative effects of environment on production and quality is vital to increase the understanding of the cultural practices of harvesting and post-harvest that affect the physiological process that determines the viability and vigor. The knowledge of the physiological effects from the cytokinins action understands one aspect of improvement of methods for assessing the morphological development of castor bean, and the biochemical pathways in which the cytokinin oxidase / dehydrogenase (CKX) are enzymes responsible for oxidation of cytokinins, substances that with the help of auxin, help cell division in plants. The aim of this study was partial isolation of cytokinin oxidase purified from seedlings of *Ricinus communis* L, BRS Energy. Accomplish with the study the characterization of castor seed in development at various stages during 11 days of germination, indicating the better aspects. The isolation of CKX in roots of seedlings of castor was carried from the molecular exclusion chromatography on a column of Sephadex G-75 and affinity chromatography and ConA- Agarose activity test. The identification of CKX was made from the antioxidant enzyme activity of CKX. The seeds of cv. BRS Energy showed in environmental conditions better development of seedlings. The profile of molecular exclusion chromatography showed two peaks, SI and SII, the first of which no activity. Peak SII was active and then applied to affinity chromatography column of ConA-agarose that allowed isolation of the peak CII with glycosylated proteins and or with other waste glycidyl. Partial purification of the CII peak in the column of ConA-Agarose was efficient and had enzymatic activity CKX.

Keywords: *Ricinus communis* L., protein, cytokinin oxidase.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Desenvolvimento e germinação de semente. Esquema geral de eventos associados com as diferenças de fase de desenvolvimento, germinação e crescimento pós-germinativo de sementes, incluindo (A) ciclo celular, eventos metabólicos e de reparo e períodos em que a semente (embrião) é intolerante ou tolerante à dessecação; (B) padrão de expressão de genes em estádios específicos, por meio de uma reparação conceptual do acúmulo de sete conjuntos de mRNA que ocorrem durante o desenvolvimento da semente28
- FIGURA 2 - Plântula da mamoneira logo após a germinação.....32
- FIGURA 3 - Plântula da mamoneira com início da diferenciação das folhas definitivas32
- FIGURA 4 - Planta da mamoneira no estágio de quatro folhas, além dos cotiledonares.....33
- FIGURA 5 - Estruturas da zeatina. A maioria das plantas têm trans-zeatina (E-6-(4-hidroxi-e-metilbutil-2-enilamino) purina) como a principal citoquinina livre.....34
- FIGURA 6 - Mecanismo de metabolização de citoquininas pela citoquinina oxidase.36
- FIGURA 7 - Sementes de mamona (*Ricinus comunis* L.) cv. BRS-Energia.....38
- FIGURA 8 - Desinfestação de sementes de *R.comunis* L.....39
- FIGURA 9 - Sementes de mamona semeadas em bandeja de isopor, à esquerda. Câmara de vegetação construída com sombrite 75 % localizada no campus da Universidade Regional do Cariri, à direita.....40
- FIGURA 10 - Plântula de mamona (*Ricinus communis* L.) utilizada para o isolamento de CKX.....40
- FIGURA 11 - Câmara climatizada para germinação das sementes de *R.comunis* com fotoperíodo de 12 h.....41
- FIGURA 12 - Esquema de fracionamento salino do extrato protéico de radículas de *R. communis* L. – BRS Energia.....44
- FIGURA 13 - Radículas de mamona (*Ricinus communis* L., cv BRS Energia), no estágio 3 (radícula maior que 2 cm e menor que 5 cm)48
- FIGURA 14 - Radículas de mamona (*Ricinus communis* L., cv BRS Energia), no estágio 4 (radícula maior que 5 cm).....49
- FIGURA 15 - Perfil de cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75 (10,1 x 0,93 cm) de F0-70 ressuspensa Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M e CaCl₂,

MgCl₂ e MnCl₂ 5 mM no tampão eluídas no mesmo tampão. Volume de amostra aplicada de 3 mL; volume da fração 2,2 mL e fluxo de 0,55 mL/min.....51

FIGURA 16 - Perfil cromatográfico da fração SII aplicada em coluna de afinidade ConA-agarose (V = 5 mL, frações de 1 mL, fluxo de 1,5 mL/min), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, com MgCl₂, MnCl₂ e CaCl₂ 5 mM cada e NaCl 0,15 M. O pico retido (CII) foi eluído com o mesmo tampão acrescido de Glicose 1 M.....52

FIGURA 17 - Eletroforese em Gel de poliacramida 12,5% na presença de SDS PAGE da fração protéica de raízes de plântulas *Ricinus communis* L., obtidos a partir das plântulas em condições ambientais. Os marcadores de massa molecular (GE Healthcare) utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa) Poço 1 – marcadores moleculares; poço 2 - extrato total; poço 3 - F0-70; poço 4 - F70; poço 5 - fração CI e poço 6 - fração CII.....53

FIGURA 18 - Gráfico de mobilidade eletroforética versus logaritmo da massa molecular aparente dos marcadores eletroforéticos fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa) e da amostra de CII da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-agarose..... 54

FIGURA 19 - Varredura da absorvância da base de Schiff formada entre 3-metil-2-butenal e p-aminofenol no tampão da reação citoquinina oxidase..... 55

FIGURA 20 - Distribuição das plântulas nos estádios de desenvolvimento.....57

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Decréscimo no conteúdo de óleo da semente da mamoneira após início da germinação.	31
2	Distribuição em estádios das plântulas de <i>R. communis</i> L. cv BRS Energia, durante 11 dias de cultivo em condições ambientais	49
3	Distribuição em estádios das plântulas de <i>R. communis</i> L. cv BRS Energia, durante 11 dias de cultivo em câmara climatizada.	50

LISTA DE QUADROS

QUADRO		PÁGINA
1	Descrição morfológica dos Estádios de Desenvolvimento de plântulas de mamona.	42
2	Propriedades de algumas citoquininas oxidases já isoladas.	59

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO		PÁGINA
1	Distribuição em estádios das plântulas de <i>R. communis</i> L. durante 11 dias de cultivo em condições ambientais.	56
2	Distribuição em estádios das plântulas de <i>R. communis</i> L. durante 11 dias de cultivo em câmara climatizada.	57

LISTA DE SIGLAS

- **AF – Agricultura Familiar;**
- **BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social;**
- **CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento;**
- **EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;**
- **EUA – Estados Unidos da América;**
- **IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;**
- **IPI – Imposto sobre Produto Industrializado;**
- **MDA – Ministério de Desenvolvimento Agrário;**
- **PROBIODIESEL – Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel;**
- **PRONAF – Programa Nacional de Agricultura Familiar.**

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE QUADROS	XIV
LISTA DE GRÁFICOS.....	XV
LISTA DE SIGLAS.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. A CULTURA DA MAMONA.....	21
2.2. MAMONA (<i>RICINUS COMMUNIS L.</i>).....	23
2.3. ECOFISIOLOGIA.....	23
2.4. EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE A MAMONEIRA	24
2.5. DEFESA VEGETAL.....	25
2.6. DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS E MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	25
2.7. CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DA PLANTA.....	30
2.8. CITOQUININAS	33
2.9. CITOQUININAS OXIDASES NA METABOLIZAÇÃO DA CITOQUININA NOS TECIDOS VEGETAIS..	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	38
3.1.1. <i>SEMENTES</i>	38
3.1.2. <i>GERMINAÇÃO</i>	39
3.1.2.1. Desinfestação e seleção das sementes.....	39

3.1.3.	<i>OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS EM CONDIÇÕES AMBIENTAIS</i>	39
3.1.4.	<i>OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS CULTIVADAS EM TNT.</i>	40
3.1.5.	<i>OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS CULTIVADAS EM CÂMARA FRIA</i>	41
3.2.	<i>CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO E MEDIDAS DE CRESCIMENTO</i>	42
3.3.	<i>ÍNDICE DE DESENVOLVIMENTO (ID)</i>	42
3.4.	<i>ISOLAMENTO DA CKX</i>	43
3.4.1.	<i>PREPARAÇÃO DA FARINHA</i>	43
3.4.2.	<i>EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS</i>	43
3.4.3.	<i>FRACIONAMENTO DO EXTRATO PROTÉICO</i>	43
3.4.4.	<i>DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES PROTÉICAS</i>	45
3.4.5.	<i>ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES PROTÉICAS</i>	45
3.4.6.	<i>CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM COLUNA DE SEPHADEX G-75</i>	46
3.4.7.	<i>CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE CONA-AGAROSE</i>	46
3.4.8.	<i>ATIVIDADE ENZIMÁTICA</i>	47
3.4.8.1.	Teste de atividade	47
3.4.8.2.	Determinação do comprimento de onda utilizado para a leitura do teste de atividade	47
4.	RESULTADOS	48
4.1.	Características de classificação das plântulas nos diversos estádios de desenvolvimento ..	48
4.2.	Caracterização Bioquímica	51
4.2.1.	<i>Extração de Proteínas</i>	51
4.2.2.	<i>Fracionamento do Extrato protéico</i>	51
4.2.3.	<i>Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75</i>	51
4.2.4.	<i>Cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Agarose</i>	52
4.3.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	51
4.4.	Atividade Enzimática	51
5.	DISCUSSÃO	51
6.	CONCLUSÕES	62
5.	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

A mamoneira é uma planta heliófila, com alta capacidade de produção de óleo. Apesar da sua adaptabilidade a uma ampla gama de condições climáticas, é exigente em calor e em irradiação, pois sua arquitetura foliar desfavorece a captação da energia incidente (BELTRÃO et al., 2001).

Devido ao hábito de crescimento indeterminado, plantas de mamona apresentam florescimento e fertilização prolongados, que ocorre junto ao desenvolvimento da planta. Assim cada racemo, fruto ou semente de uma planta pode ser formado em condições edafoclimáticas diferentes. Cada mamoneira produz vários racemos que amadurecem de forma escalonada e desuniforme, a maturação dos frutos dentro de cada racemo também é desigual. Portanto, sementes colhidas em diferentes racemos, ou posições no racemo, são afetadas pelas condições ambientais vigentes antes e durante a sua formação podendo apresentar tamanho, peso, composição química, germinação e vigor distintos. Essas características podem influenciar a qualidade inicial das sementes e o seu potencial de armazenamento.

Para cultivares indeiscentes, a colheita dos frutos é realizada em uma única etapa, quando os racemos estão totalmente secos. Porém a colheita em uma única operação pode comprometer a qualidade do lote, pois este será composto por sementes em diferentes estádios de maturação. Assim, as pesquisas na área de produção e controle de qualidade de sementes de mamona se justificam pela necessidade do mercado de sementes de qualidade, escassez de informações referentes à tecnologia de produção, aumento da área plantada com a cultura e potencialidade da espécie (OLIVEIRA et al., 2006). Apesar dos avanços em tecnologia de produção e de desenvolvimento de novas cultivares que minimizam efeitos negativos do ambiente sobre a produção e a qualidade, é essencial aumentar o entendimento de como práticas culturais de colheita e pós-colheita afetam o processo fisiológico que determina a viabilidade e o vigor, pois a produção de sementes de baixo vigor é um problema crônico que as empresas produtoras de sementes se defrontam a cada ano (VIEIRA, 1999).

A deterioração da semente também prejudica a organização molecular, a estrutura celular e dos tecidos, e o desempenho individual ou populacional da semente, reduzindo a qualidade do lote (MATTHEWS, 1985; CARNEIRO, 1985 e NODARI et .al., 1998).

O crescimento da planta está ligado ao balanço citoquininas/auxinas. Enquanto as citoquininas induzem a divisão celular, as auxinas induzem a alongação das células promovendo o crescimento de brotos. Células vegetais já diferenciadas normalmente param de se multiplicar. Adicionando-se citoquininas e auxinas estas células diferenciadas podem ser induzidas a recomeçarem a se multiplicar formando massas disformes de células, os "callus". Em cultura de tecidos, a razão citoquininas/auxinas é utilizada para induzir estas células na formação de brotos (maior proporção de citoquininas) ou raízes (maior proporção de auxinas). O uso de citoquininas em escala comercial como estimuladores de crescimento vegetal é difundido, como exemplos podemos citar FARTUM® DRY FOLIAR e AGROKELP (TORRES, CALDAS e BUSO, 1998). As citoquininas, importantes hormônios vegetais, são seletivamente inativadas por clivagem oxidativa. A enzima que catalisa esta degradação é conhecida como citoquinina oxidase, contudo resultados recentes indicam que a enzima utiliza um diferente receptor de elétrons oxigênio; portanto, reclassificação como citoquinina desidrogenase (CE 1.5.99.12) tem sido sugerido para evitar confusão, apenas a abreviatura CKX será utilizada para a enzima.

A regulação da atividade citoquinina oxidase no calo de tecidos de *Phaseolus vulgaris* foi analisada utilizando um teste baseado na oxidação de 6-(γ,γ - dimethylalilamino)purina (isopentenil adenina, iP) a adenina. A especificidade da citoquinina oxidase sugere que desempenha um papel importante na regulação dos níveis de citoquinina nos tecidos vegetais, mas o verdadeiro significado fisiológico e de desenvolvimento da enzima ainda não está estabelecido. Soluções de citoquininas exógenas aplicadas diretamente na superfície do calo de tecidos induzem aumento relativamente rápido na atividade citoquinina oxidase. O aumento da atividade foi detectado depois de 1 hora e continuou por cerca de 8 horas, atingindo valores de duas a três vezes mais elevados que os dos controles.

Atualmente pesquisas sobre as funções biológicas de citoquininas têm sido principalmente derivadas de estudos sobre as consequências da citoquinina aplicada exógenamente ou endógenamente reforçada pelos níveis de citoquinina. Até agora, não foi possível abordar a questão reversa, porém as consequências

para o crescimento das plantas e se o desenvolvimento endógeno da concentração citoquinina é diminuído ou não.

O programa de Melhoramento da Mamoneira deve identificar e/ou sintetizar genótipos de mamoneira que se adaptem às condições edafoclimáticas do Nordeste, visando a distribuição de cultivares mais produtivas, semideiscentes, de porte médio, precoce, elevado teor de óleo na semente e resistentes às principais doenças da região (VIEIRA et al, 1999).

Este estudo tem como objetivo isolar e purificar parcialmente uma citoquinina oxidase em raízes de plântulas de *Ricinus comunis* L cv. BRS-Energia, caracterizando a semente de mamona em seu desenvolvimento em diversos estádios durante 11 dias de germinação. Assim como evidenciar as melhores condições de desenvolvimento de plântulas de mamona - *R.communis* L, c.v. BRS Energia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da mamona

A mamoneira é uma das 7000 espécies da família Euphorbiaceae e é originária, possivelmente, da antiga Abissínia, hoje Etiópia. No Brasil, a sua adaptação às condições edafoclimáticas foi plena, sendo encontrada, praticamente, em todo o território nacional (SAVY FILHO, 1997).

No Brasil, a região Nordeste tem destaque na produção, principalmente no Estado da Bahia que apresenta a maior área plantada, 149.623 ha, e uma baixa produtividade média, 772 kg ha⁻¹. O Estado de São Paulo destaca-se pela sua produtividade média de 1.622 kg ha⁻¹, inferior somente a do Paraná com 1843 kg ha⁻¹ (IBGE, 2009). Em São Paulo, as regiões de Presidente Prudente, Alta Paulista e São José do Rio Preto, destacam-se como as principais e ecologicamente favoráveis ao cultivo da mamona (MYCZKOWSKI, 2003). A importância da cultura da mamoneira deve-se à grande aplicabilidade de seu óleo na fabricação de lubrificantes, espessantes, impermeabilizantes de tecidos, fungicidas, filmes antiferrugem, plastificante para borrachas, graxas resistentes a óleo e água, fluídos

hidráulicos, antiespumantes, sabões especiais, aditivos para tintas, emulsões estáveis para produtos de limpeza, papel aluminizado, estabilizantes de perfumes, lubrificantes de alto desempenho e polímeros; além da torta de mamona que pode ser utilizada como adubo ou na alimentação animal se for tratada para a inativação da ricina (ROLIM, 1981; CHIERICE e NETO, 2001; FREIRE, 2001).

A grande aplicabilidade do óleo de mamona advém de um dos seus principais componentes, o ácido ricinoléico, que é o único solúvel em álcool. Os grupos funcionais deste componente permitem que o óleo da mamona possa ser submetido a diversos processos químicos, resultando em diferentes produtos (CHIERICE e NETO, 2001). A busca de fontes alternativas de energia capazes de substituir o petróleo motivou o incremento da área plantada com mamona no país, a partir da criação do Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (PROBIODIESEL). Este programa também pretende reduzir o nível de desemprego e aumentar a distribuição de renda, determinando que 40% da produção de biodiesel tenham como matéria-prima a mamona, produzida com base na agricultura familiar (ALMEIDA et al., 2004). Adicionalmente, existe uma pressão internacional de substituição dos combustíveis fósseis, como o petróleo e o gás natural por óleo e álcool de origem vegetal, por serem fontes de energia sustentável, renovável e menos poluidoras do ambiente. Neste contexto, a mamoneira ganha importância por conter aproximadamente 47% de óleo em suas sementes (CHIERICE e NETO, 2001). A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira ocorreu a partir de 13 de janeiro de 2005, quando foi publicada a Lei 11.097 estabelecendo a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado em qualquer parte do território nacional. O percentual obrigatório estabelecido foi de 2 e 5%, respectivamente, três a oito anos após a publicação da lei (BRASIL, 2007). Devido a estas medidas governamentais a cultura da mamona teve uma grande expansão (OLIVEIRA et al., 2006).

A escolha da região para a instalação de um campo de produção de sementes é primordial para que se consiga alcançar a qualidade desejada, e os principais fatores a serem observados são a temperatura, o fotoperíodo e a precipitação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Condições ambientais favoráveis durante o processo de maturação são importantes para que as sementes acumulem as reservas necessárias para o processo de germinação, e apresentem elevado vigor e potencial de conservação (MARCOS FILHO, 2005). No entanto,

temperaturas altas, chuvas freqüentes e alta umidade relativa do ar na época da colheita, podem resultar em rápida deterioração, com reduções de germinação e de vigor das sementes (DELOUCHE, 1980).

2.2. Mamona (*Ricinus communis* L.)

Ricinus communis L.(mamona) é uma Euphorbiacea de origem Indiana ou Africana. Apesar da dúvida sobre sua procedência esta planta é conhecida desde a antiguidade pelos egípcios. A mamoneira atinge dez metros de altura em estado silvestre e floresce ao final do verão. É também conhecida como rícino, palma-cristo e carrapateira em nosso país (FORNAZIERI-JÚNIOR, 1986). A mamoneira se apresenta em forma de arbusto quando cultivada e pode crescer em diferentes condições, em vários tipos de solos e condições ambientais podendo, assim, ser um modelo útil para análise de mecanismos de sinalização e defesa. Sua composição química varia com o cultivar e a região do cultivo, apresentando em média 48 % de óleo, 17,9 % de proteína, 13,0 % de carboidratos, 12,5 % de fibra, 5,5 % de umidade e 2,5 % de cinzas (FREIRE, 2001).

Em virtude da pouca utilização de sementes selecionadas ocorrem, na maioria das grandes regiões produtoras de mamona, baixa produtividade, alto nível de suscetibilidade às principais doenças e pragas, e várias características agrônômicas indesejáveis. Há, portanto, necessidade, por meio do melhoramento genético, da obtenção e distribuição de genótipos de mamoneira adaptados às diversas regiões produtoras do país (FREIRE et al., 2001).

A associação entre patógenos e sementes pode afetar de forma severa a qualidade dessas sementes, reduzindo seu potencial germinativo, vigor, emergência, período de armazenamento e até seu rendimento (MACHADO, 1988).

2.3. Ecofisiologia

A mamoneira é uma planta adaptada ao calor, necessitando pelo menos de 2000°C de unidades de calor, com temperatura do ar acima de 10°C, com ideal de

3800°C, nas condições da Rússia. No tocante à temperatura média do ar, o ótimo ecológico está entre 20°C e 30°C, com o ideal de 23°C, em que o ponto de compensação térmico é mais equilibrado, com maior saldo fotossintético graças à redução da taxa respiratória e, assim, incremento da fotossíntese líquida, com redução significativa da taxa de fotorrespiração, que é dependente demais da temperatura ambiente (MOSHKIN, 1986).

2.4. Efeitos da Temperatura sobre a Mamoneira

A mamoneira, para produzir bem em regime de sequeiro no semi-árido brasileiro, necessita de pelo menos 500 mm de precipitação pluvial, temperatura média do ar entre 20°C e 30°C e altitude de pelo menos 300 m, constituindo esses elementos à base do zoneamento agroecológico da mamoneira na Região Nordeste do Brasil. Ela é favorecida pelo orvalho que representa uma entrada de energia no sistema, e produz bem em ambientes onde a temperatura noturna não seja elevada, ou seja, em torno de 20°C, o que não ocorre em baixas altitudes – caso do litoral do Nordeste cuja temperatura do ar, à noite, atinge frequentemente mais de 30°C – aumentando a respiração oxidativa mitocondrial e reduzindo a fotossíntese líquida, o crescimento em geral, reduzindo o número de frutos dos cachos, elevando o número de flores masculinas e promovendo maior taxa de aborto das flores femininas. Com a temperatura noturna elevada, em torno dos 30°C, a respiração incrementa, em especial a não acoplada à produção do ATP e do NADH + H⁺ denominada de “resistente ao cianeto”; a planta para compensar aumenta a produção de folhas (CORRÊA, 2007), fontes de produção de assimilados, na tentativa de incrementar a fotossíntese durante o dia, disso resultando o desbalanceamento de hormônios e a redução do processo de floração e frutificação, além da possibilidade de reversão da sexualidade das flores da mamona.

2.5. Defesa Vegetal

Quando feridas, as plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares, como um mecanismo de resposta a esse tipo de estresse. Muitas dessas alterações podem estar diretamente relacionadas com defesa e proteção. Para sobreviver, durante sua evolução, elas desenvolveram mecanismos de resposta a danos e doenças que, quando acionados, reconhecem a agressão. Saber como os vegetais se protegem é essencial para obter, por meio da bioengenharia, variedades agrícolas mais resistentes, o que poderia aumentar a produção e a qualidade da planta em questão. Por isso, diversos grupos de pesquisa buscam definir o papel de cada substância participante dos processos bioquímicos de defesa das plantas (SHEWRY e LUCAS, 1997).

Uma das principais revelações das pesquisas sobre defesa vegetal é que a resistência a pestes e patógenos é usualmente complexa e tem como base, a ação combinada de diversos fatores e não um componente somente. Uma distinção fundamental é geralmente feita entre defesas pré-existentes ou constitutivas das plantas e sistemas induzidos pela agressão da peste ou patógeno. As defesas vegetais podem ser também classificadas como estruturais baseadas em características anatômicas, e químicas, baseadas em compostos biologicamente ativos de massa molecular (SHEWRY e LUCAS, 1997).

A defesa estrutural é encontrada nas mais diversas partes da planta. A presença de pêlos, espinhos, tricomas e ceras recobrimo principalmente a superfície de caules e frutos, são exemplos típicos dessas estruturas de defesa (BOWLES, 1990).

A importância de proteínas como forma de defesas constitutivas de plantas é um assunto estudado há muito tempo, como exemplo, o estudo de Ryan e Balls (1962) constatou, pela primeira vez, a presença de inibidores de proteinases em solanáceas. Posteriormente, inibidores de proteinases também foram relacionados a processos de defesas induzidos por ferimento em folhas de tomate e batata, tanto no local da agressão, quanto em locais afastados (GREEN e RYAN, 1972). Os inibidores de proteinases interagem com as proteinases do intestino de insetos e afetam negativamente a proteólise do alimento ingerido, reduzindo a disponibilidade de aminoácidos essenciais e retardando o crescimento e seu desenvolvimento (CONSTABEL e RYAN, 1995). As proteínas protetoras têm expressão significativa e

podem ser descritas como constitutivas ou tecidos específicas, sendo restrita a órgãos, tecidos ou tipos celulares específicos. Esse tipo é particularmente distribuído em sementes e em alguns tecidos vegetativos (SHEWRY e LUCAS, 1997).

Dentre as substâncias relacionadas à defesa química, destacam-se aminoácidos não protéicos, alcalóides, fenóis, saponinas, lectinas, RIPs (proteínas inativadoras de ribossomos) quitinases, glucanases, flavonóides, inibidores de proteases e alérgenos (BOWLES, 1990; XAVIER FILHO, 1993). As proteínas protetoras, citadas anteriormente, também podem ser induzidas em resposta à infecção, dano ou predação. Entre elas estão as proteínas relacionadas à patogênese (PR), que por sua vez são subdivididos em diversos grupos (β -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases, etc) (SHEWRY e LUCAS, 1997).

Fatores anatômicos constitutivos e químicos, como cutículas, parede celular e inibidores pré-formados podem ser suficientes para prevenir a colonização de tecidos vegetais. Se a penetração ocorrer, o sistema de defesa induzido é ativado. Este inclui a rápida geração de espécies reativas de oxigênio, alterações em polímero da parede celular, síntese de metabólitos de baixo peso molecular como as fitoalexinas, produção de novas classes de proteínas relacionadas à defesa e uma resposta de hipersensibilidade seguida por morte celular programada. Coletivamente, esses sistemas primeiro inibem, e depois impedem o potencial colonizador (SHEWRY e LUCAS, 1997).

Várias pesquisas constataram que estresses bióticos ou abióticos levam a alteração no padrão de expressão de proteínas das plantas, podendo ocorrer tanto a inibição quanto à indução da biossíntese de determinados constituintes protéicos. Em 1972, por exemplo, Green e Ryan verificaram que há indução de inibidores de proteinases em tomate, como um mecanismo possível de defesa contra insetos. Cavalcante e colaboradores relataram, em 1999, que o metil-jasmonato altera os níveis da enzima rubisco e de outras proteínas.

Diferentes partes da planta, que passaram por injúria, podem responder de maneiras diferentes a uma dada lesão. Além disso, plantas de idades diferentes podem apresentar diferentes níveis de expressão protéica em partes vegetais semelhantes (BUCHANAN, GRUÍSSEM e JONES, 2000). Estudos de Malone e Alarcon (1995) relataram que a idade da planta influencia a indução de inibidores de proteinase em resposta a injúria em tomate. Esses dados evidenciam que a

expressão de proteínas em plantas feridas não é um processo somente dependente da lesão, mas também do estado fisiológico do vegetal.

2.6. Desenvolvimento de Plantas e Mobilização de Proteínas

O ciclo de vida em plantas superiores compreende o desenvolvimento de uma semente seguido por sua germinação e período pós-germinativo, e o desenvolvimento por meio do crescimento da planta. Para tanto, diversos eventos específicos estão envolvidos nesse processo, como processos fisiológicos e morfológicos (CASTRO, BRADFORD e HILHORST, 2004).

Diversos estudos sobre os mecanismos regulatórios que controlam os processos morfofisiológicos das plantas só passaram a serem descritos depois do surgimento de técnicas genéticas e moleculares (BEWLEY e BLACK, 1994; GOLDBERG et al, 1994; HARADA, 1997; RAGHAVAN, 1997). Desse modo, a análise de mudanças nos padrões da expressão de genes que ocorrem durante o desenvolvimento da semente e o crescimento pós-germinativo tem contribuído com indícios sobre os programas regulatórios que controlam ambos os períodos (PENG e HARBERD, 2002; NAMBARA e MARION-POLL, 2003).

Ao longo das últimas décadas, diversas espécies tornaram-se modelos para estudos da biologia da semente. Como exemplo, a semente de *Lycopersicon esculentum* (tomate) que tem sido usada para estudar a fisiologia e bioquímica do desenvolvimento de sementes, germinação e a dormência (DE CASTRO e HILL HORST, 2000). Ao mesmo tempo, a compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento e germinação de sementes contribui para o controle do desenvolvimento, principalmente nos níveis molecular e hormonal (CASTRO, BRADFORD e HILHORST, 2004).

A primeira fase é caracterizada pelo crescimento inicial devido ao início primário da divisão celular e ao aumento rápido do peso fresco da semente inteira e do conteúdo de água. Durante essa etapa, a histodiferenciação e a morfogênese da semente (Figura 1) acontecem à medida que o zigoto unicelular se submete a divisões mitóticas extensivas, e as células resultantes se diferenciam para dar forma ao plano básico do corpo do embrião (YADEGARI e GOLDBERG, 1994).

Concomitantemente, há a formação do endosperma. A divisão de células acaba relativamente cedo no desenvolvimento da semente. Depois disso há uma fase intermediária de maturação, na qual a semente aumenta de tamanho devido, principalmente, à expansão de células e deposição de reservas como proteínas, lipídios e carboidratos, nos tecidos de armazenamento (cotilédones, endosperma ou megagametófito).

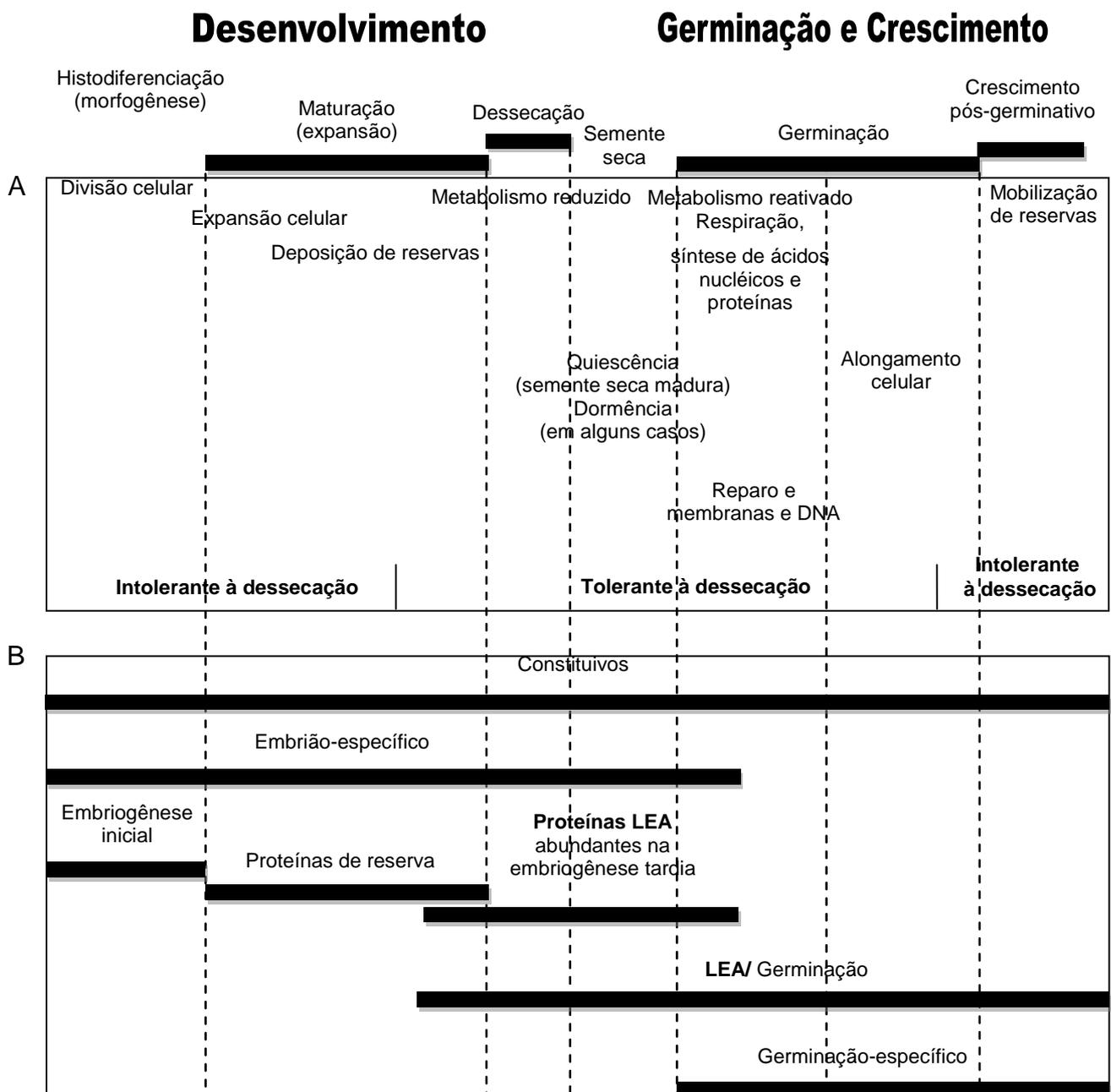


Figura 1 - Desenvolvimento e germinação de sementes. Esquema geral de eventos associados com as diferenças de fase de desenvolvimento, germinação e crescimento pós-germinativo de sementes, incluindo (A) ciclo celular, eventos metabólicos e de reparo e períodos em que a semente (embrião) é intolerante ou tolerante à dessecação; (B) padrão de expressão de genes em estádios específicos, por meio de uma reparação conceitual do acúmulo de sete conjuntos de mRNA que ocorrem durante o desenvolvimento da semente. Adaptada a partir de CASTRO, BRADFORD e HILHORST, 2004.

Finalmente, o desenvolvimento da semente termina com uma fase pré-programada da secagem de maturação ou dessecação. Nesse estado, a semente pode sobreviver aos estresses ambientais e, a menos que esteja dormente, recomeçará a atividade metabólica, o crescimento e o desenvolvimento quando as circunstâncias condutoras à germinação e o crescimento forem fornecidas (BEWLEY e BLACK, 1994).

Uma vez fornecidas as condições para desenvolvimento da semente, sua germinação acontecerá a partir da emergência de parte da planta do solo ou da formação de uma plântula vigorosa sobre algum tipo de substrato (BORGHETTI, 2004). Para Labouriau (1983) a semente é considerada germinada quando uma das partes do embrião emerge de dentro dos envoltórios, acompanhada de algum sinal de metabolismo ativo, como a curvatura da radícula.

Bewley e Black (1994) e Obroucheva (2000) descrevem que o processo germinativo pode se estender de horas a dias, dependendo da espécie em estudo. Estes autores afirmam ainda que, quando sementes viáveis secas absorvem água, uma corrente de eventos é desencadeada resultando na emergência da radícula. Na embebição, o metabolismo rapidamente recomeça.

Com o início da embebição da semente, o ciclo celular é ativado, assim como a síntese de proteínas, que tem a função de dar suporte à manutenção do crescimento do embrião, normalmente suportando o crescimento da plântula até que ela se torne autótrofa (BEWLEY, 1997; BUCKERIDGE, et al., 2004). Síntese de β -tubulina, uma proteína presente durante a divisão e a expansão celular, ocorre no embrião de sementes de tomate (CASTRO et al, 2000) e café (DA SILVA, 2000). Síntese de proteínas relacionadas com o crescimento do embrião funciona como uma preparação inicial para o crescimento da radícula durante a germinação e, após a protrusão, no estabelecimento da plântula (MELO, 2005), porém as reservas protéicas, segundo Mickey (1994), não têm efeito sobre o crescimento da plântula, pois os seus aminoácidos são convertidos geralmente a amidas após a hidrólise do composto.

Diversos experimentos estão sendo voltados para o estudo do funcionamento desses processos bioquímicos e fisiológicos que culminam no desenvolvimento da planta, porém ainda não permitem uma abordagem integrada de todos eles. Por enquanto, a maioria do que se encontra na literatura compreende experimentos

isolados em que sementes são submetidas, por exemplo, à ação de um fitormônio, e seus efeitos mediados pela dosagem da atividade enzimática e das proteínas correspondentes pelo aumento de transcrição de genes, dentre outros (BUCKERIDGE et al, 2004).

Diversos fitormônios estão relacionados com a modulação celular de maneira a promover o crescimento da plântula ou alongamento embrionário (DEY e HARBONE, 1997). Estas substâncias são produzidas em células específicas de todos os tecidos da planta e distribuídas aos vários órgãos via xilema, para controle do metabolismo e expressão gênica. Entre estas substâncias, que vão desde moléculas bem simples, como etileno, até grandes moléculas orgânicas, como as giberelinas, incluem-se as citoquininas (HELDT, 1997).

2.7. Crescimento e Desenvolvimento da Planta

De acordo com Moshkin (1986), a mamoneira tem, na sua organogênese, 12 fases ou estágios de desenvolvimento, dependendo da duração de cada um, da cultivar e das condições ambientais. O primeiro é o da germinação, e o segundo é o da formação das folhas opostas verdadeiras, que se estende de 7 a 17 dias. O terceiro estágio envolve a segmentação do eixo do racemo, que ocorre rapidamente, e finaliza com a formação da quinta ou da sexta folha verdadeira, com a iniciação da gema axilar lateral. O quarto estágio consiste na diferenciação celular e na formação do racemo, fato que se verifica de 7 a 18 dias. Já o quinto estágio é o da diferenciação da parte floral, que demora de 10 a 17 dias. O sexto engloba a formação do pólen e do saco embrionário; enquanto o sétimo consiste na diferenciação e no crescimento do racemo. O oitavo corresponde à fase de botoamento; o nono, à floração e à polinização; o décimo, à formação dos frutos e das sementes; o décimo primeiro, à deposição da cera; e finalmente, o décimo segundo, a maturação (Tabela 1).

Tabela 1
Decréscimo no conteúdo de óleo da semente da mamoneira
após início da germinação

Dias de Início da germinação	Conteúdo do Óleo			Estágio do crescimento
	Semente Total	Endosperma	Embrião	
1	66,8	66,4	78,1	Completa embebição da semente
2	66,3	66,2	71,4	Aparecimento da raiz primária
3	61,6	64,8	44,3	Raiz primária com 3,0 cm de cm de comprimento
4	59,4	62,0	38,2	Aparecimento das raízes laterais e de pigmentos no hipocótilo
5	56,5	60,3	32,0	Surgimento de cotilédones, que se tornam coloridos
6	52,8	58,5	30,3	Endosperma crescido
8	33,1	44,3	20,9	Idem
10	27,2	39,9	20,0	Início da liberação dos cotilédones do endosperma
12	23,2	39,2	16,9	Cotilédones livres do endosperma
14	15,2	22,7	14,2	

Fonte: Kichenko, citado por Sevast' Yanona (1986).

Nas Figura 2, 3 e 4 se podem observar os primeiros estádios do desenvolvimento desta planta.



Figura 2 - Plântula da mamoneira logo após a germinação. Foto: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão.



Figura 3 - Plântula da mamoneira com início da diferenciação das folhas definitivas.



Figura 4 - Planta da mamoneira no estágio de quatro folhas, além dos cotilédones.

2.8. Citoquininas

As citoquininas são fitohormônios que estimulam, através da ativação de replicação e transcrição, a divisão celular e retardam a senescência em vegetais, sendo considerados indicadores para classe de reguladores de crescimentos tendo sido descobertas durante as pesquisas dos fatores que estimulam a citocinese das células vegetais (MOK, MOK e ARMSTRONG, 1978).

A descoberta da cinetina foi importante na demonstração que a divisão celular pode ser induzida por uma simples substância química. Diversas citoquininas foram descobertas e são derivadas da adenina com substituições em seu nitrogênio 6. A citoquinina mais comum, a zeatina, tem um resíduo isopreno hidroxilado na posição *trans*, ligado ao nitrogênio amino da adenina. Nos vegetais superiores, a zeatina ocorre tanto na configuração *cis* e *trans*, formas essas que podem ser interconvertidas por uma enzima chamada de zeatina isomerase (MOK, MOK e ARMSTRONG, 1978).

Figura 5 - Estruturas da zeatina. A maioria das plantas têm trans-zeatina (E-6-(4-hidroxi-e-metilbutil-2-enilamino) purina) como a principal citoquinina livre.

É nos meristemas dos ápices das raízes das plantas que ocorre a maior síntese de citoquininas livres. Estas parecem se mover pelo xilema até a parte aérea, juntamente com a água e os sais minerais. Entretanto as raízes não são as únicas partes capazes de sintetizar citoquininas. Por exemplo, os embriões jovens de milho sintetizam citoquininas, assim, como as folhas jovens em desenvolvimento, frutos jovens e possivelmente muitos outros tecidos (TAIZ, e ZEIGER, 2004).

Embora tenham sido descobertas como fatores da divisão celular, as citoquininas podem estimular ou inibir uma variedade de processos fisiológicos, metabólicos, bioquímicos e de desenvolvimento, quando aplicadas às plantas superiores, sendo cada vez mais evidente que as citoquininas endógenas exercem importante função na regulação destes eventos.

O crescimento da planta está ligado ao balanço citoquininas/auxinas, enquanto as citoquininas induzem a divisão celular, as auxinas induzem a alongação das células promovendo o crescimento de brotos. Células vegetais já diferenciadas normalmente param de se multiplicar, adicionando-se citoquininas e auxinas estas células diferenciadas podem ser induzidas a recomeçarem a se multiplicar formando massas disformes de células, os *callus*. Em cultura de tecidos, a razão citoquininas/auxinas é utilizada para induzir estas células na formação de brotos (maior proporção de citoquininas) ou raízes (maior proporção de auxinas (TORRES, CALDAS e BUSO, 1998).

A metabolização das citoquininas nos tecidos vegetais é realizada rapidamente a partir da sua conversão em suas respectivas formas nucleosídea e nucleotídea. Tais interconversões provavelmente envolvam enzimas comuns ao metabolismo das purinas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

As citoquininas oxidases são responsáveis pela degradação destas moléculas dando como produtos adenina e um produto aldeídico resultante da quebra de sua cadeia lateral (SCHMÜLLING et al, 2003).

Dietrich e colaboradores (1995) demonstraram uma correlação temporal entre o decréscimo dos níveis de citoquinina e o aumento dos níveis de citoquinina oxidase nos núcleos desenvolvedores do milho. Isto leva a crer que uma das funções da citoquinina oxidase (CKX) pode destruir a citoquininas endógenas no momento preciso de seu desenvolvimento.

Chatfield e Armonstrong (1986) também demonstraram a relação entre o aumento de níveis de citoquinina exógenas em cultura de *callus* de *P.vulgaris* e elevados níveis de atividade de CKX. Este aumento da atividade enzimática ocorre rapidamente e parece necessitar de RNA e síntese protéica.

A relação entre CKX e produção de grãos de arroz foi demonstrada por Ashikari et al (2005). A expressão reduzida de CKX em linhagens isogênicas de arroz (*Oriza sativa* L.) provoca a acumulação de citoquininas em meristemas inflorescentes e aumenta o número de órgãos reprodutivos aumentando, assim, o rendimento de grãos.

Outro papel alternativo para a CKX de milho pode ser a proteção contra a invasão de patógenos já que os fungos patógenos de milho são, sabidamente, capazes de produzir citoquininas (MILLS e VAN STADEN, 1978; ANGRA, MANDAHAR e GULATI, 1990).

Caracterização da especificidade de substrato e outras propriedades bioquímicas destas oxidases têm sido limitadas pela relativa impureza das preparações enzimáticas e a ausência de testes precisos e rápidos. No entanto, relatórios anteriores constataram que a citoquinina oxidase do milho tem preferência de substrato para isopenteniladenina, embora o relato de propriedades físicas e cinéticas da enzima tenha variado entre os estudos (ARMSTRONG, 1994; HARE e VAN STADEN, 1994).

2.9. Citoquininas oxidases na metabolização da citoquinina nos tecidos vegetais

Muitos tecidos vegetais possuem a enzima citoquinina oxidase, a qual cliva a cadeia lateral da zeatina (ambas cis e trans), mas não cliva seus derivados glicosídeos (Figura 6). A CKX inativa irreversivelmente as citoquininas, podendo ser importante na regulação ou limitação dos efeitos da citoquinina. A atividade da enzima é induzida por altas concentrações de citoquinina devido, pelo menos em parte, ao aumento dos níveis do RNA de um subgrupo de genes.

Figura 6 – Mecanismo de metabolização de citoquininas pela citoquinina oxidase. Adaptado de POPELKOVÁ, H, et al., 2006.

Em *Arabidopsis*, a CKX é codificada por uma família multigênica, cujos membros apresentam padrões distintos de expressão. Curiosamente, vários genes possuem sinais secretores putativos, sugerindo que pelo menos algumas dessas enzimas possam ser extracelulares.

A caracterização molecular e bioquímica de CKX de milho foi feita por Bilyeu e colaboradores em 2001. A expressão de CKX de milho em *Pichia pastoris* levou à produção de grandes quantidades de CKX recombinante e possibilitou os estudos estruturais e de cinética. Estes estudos revelaram que a potencialidade da ação das citoquininas parece ser característica das diferentes variedades de plantas. Em uma variedade de *P. lunatus*, a trans-zeatina se mostrou 3x mais efetiva que a diidrozeatina e 30x mais efetiva que a cis-zeatina. As atividades de N⁶-isopentiladenina e N⁶(Δ^2 -isopentenil) adenina foram bem similares. No entanto, numa variedade de *P. vulgaris* a diidrozeatina foi pelo menos 30x mais ativa que ambas trans e cis-zeatina, e a N⁶-isopentiladenina foi 100x mais ativa que N⁶(Δ^2 -isopentenil) adenina (MOK, MOK e ARMSTRONG, 1978).

Cinco diferentes substratos foram utilizados em estudos de cinética das reações de CKX de milho (*Zea mays*). As correlações entre a cinética de tais reações e a estrutura cristalina da CKX foram estabelecidas e os estudos indicaram que a enzima reconhece as citoquininas a priori, interagindo com o resíduo adenina

e, a partir daí, acomodando os vários tipos de cadeias laterais. As clivagens catalíticas de todas as citoquininas estudadas ocorreram com a formação inicial de um intermediário único, um complexo binário entre a imina correspondente à citoquinina e a enzima reduzida (POPELKOVÁ et al, 2006).

Assumindo que existem duas espécies da citoquinina oxidase de *Zea mays*, o estudo demonstrou que, para as citoquininas que rapidamente reduzem o cofator flavina, isopenteniladenina e trans-zeatina, a interação com a citoquinina oxidase produz um complexo onde o derivado imina da citoquinina está firmemente ligado próximo à flavina, no topo de seu anel isoaloxazina. A N-metilação da isopenteniladenina afeta profundamente a reatividade das citoquininas com a enzima, o resultado é que ambas as espécies enzimáticas atuam diferentemente no processo de clivagem deste substrato. A clivagem da N-metil-isopenteniladenina ocorre lentamente através de um mecanismo diferente que resulta na produção de uma imina. Este estudo demonstra claramente a importância da estrutura da citoquinina oxidase no estabelecimento das rotas metabólicas das citoquininas.

A produção de citoquinina oxidase recombinante permitiu ainda observar, através de análises de western blotting com anticorpos monoclonais, que ambas as CKX (selvagem e recombinante) eram reconhecidas igualmente por anticorpos. No entanto, havia diferença em seu tamanho aparente demonstrado por SDS-PAGE. Após a deglicosilação das enzimas, tal diferença desapareceu indicando, então, padrões diferenciados de glicosilação nas CKX das duas fontes. A glicosilação da citoquinina oxidase parece ser conservativa nas espécies já que uma coluna de afinidade com ConA (lectina de *Canavalia ensiformis*) imobilizada foi utilizada para o isolamento de citoquinina oxidase de milho (BILYEU, et al, 2001), de raízes de plântulas de *P. vulgaris* (ARAÚJO, 2009) e de cultura de callus de *P. vulgaris* (CHATFIELD e ARMSTRONG, 1986) embora tenha sido mostrado que cerca de 20 % da citoquinina oxidase de *P. vulgaris* não se ligou à coluna podendo se tratar de proteínas não-glicosiladas, isoformas ou mesmo produto de degradação obtidos durante os procedimentos de isolamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no município de Crato (CE), localizado a 426 m de altitude, 7°14' de latitude sul e 39° 24' de longitude oeste de temperaturas mínimas de aproximadamente 15 °C até máximas de 35 °C e no município de Aracaju (SE), localizado a 10° 54' de latitude sul e 37° 04' de longitude oeste, com altitude média de 4 m e temperatura média anual de 25 °C.

3.1. Material vegetal

3.1.1. Sementes

Sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar BRS-ENERGIA, produzidas pela Embrapa Algodão, Centro Nacional Pesquisa de algodão, Campina Grande; embaladas em papel multifoliado, polipropileno trançado e polietileno preto em condições ambientais de Campina Grande – PB foram utilizadas na pesquisa.

Os grãos da cultivar BRS Energia (Figura 7) foram armazenados em sacos Kraft sob temperatura de ar refrigerado em torno de 21 °C e umidade relativa de 20 %. Parte do material foi submetida à caracterização bioquímica, e parte levada à germinação para posterior identificação e isolamento da citoquinina oxidase.



Figura 7 - Sementes de mamona (*Ricinus communis*) cv. BRS-Energia.

3.1.2. Germinação

3.1.2.1. Desinfestação e seleção das sementes

As sementes foram selecionadas para a germinação de acordo com o tamanho, conformação e cor, sendo excluídas as pequenas e mal formadas. As sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio, contendo 1 % de cloro ativo diluída 1:3 (v,v), durante cinco minutos (Figura 8) e em seguida foram lavadas exaustivamente com água deionizada (GOMES-FILHO e PRISCO, 1978). Foram excluídas as sementes que flutuaram na solução, bem como aquelas que apresentaram “deformação” após o tratamento, indicando danos mecânicos.

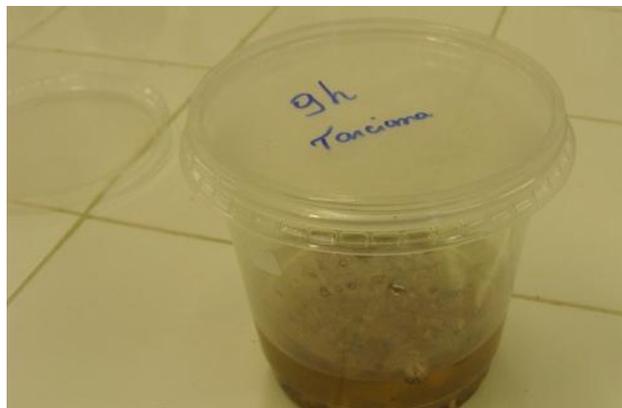


Figura 8 - Desinfestação de sementes de *R.comunis*.

3.1.3. Obtenção de Plântulas em condições ambientais

Após o tratamento de desinfestação de 100 sementes e seleção, 88 sementes viáveis foram colocadas para germinar em bandejas de isopor e em câmara de vegetação construída com sombrite 75 % (5 m²) localizada no campus da Universidade Regional do Cariri, na cidade de Crato/CE ou em bandejas de isopor em condições ambientais na cidade de Aracaju/SE sendo regadas duas vezes ao dia (Figura 9).

A coleta ocorreu no décimo primeiro dia, seguida de cortes para separar as partes morfológicas (radícula, hipocótilo, folhas) que foram armazenadas a 4°C. As condições climáticas vigentes variaram entre 28°C a 35°C.

Para o isolamento de CKX foram utilizadas plântulas de um mínimo de 16 a 20 cm de comprimento (Figura 10). As plântulas foram colhidas e selecionadas de acordo com a morfologia completa (radícula, hipocótilo e folhas), e descartadas as de morfologia incompleta.



Figura 9 - Sementes de mamona semeadas em bandeja de isopor, à esquerda. Câmara de vegetação construída com sombrite 75 % localizada no campus da Universidade Regional do Cariri, à direita.



Figura 10 – Plântula de mamona (*Ricinus communis* L.) utilizada para o isolamento de CKX.

3.1.4. Obtenção de plântulas cultivadas em TNT.

Após o mesmo tratamento de desinfestação e seleção, sementes foram colocadas para germinar em sacos de TNT de 30 x 18 cm (divididos em 10 raias de 3,0 cm, nas quais eram dispostas as sementes), desinfetados com hipoclorito de sódio 4 %, durante 1 hora, enxaguados com água destilada até a remoção total do hipoclorito, e umedecidos com carbonato de sódio (1,05 %). As sementes, em número de 10 por saquinho, foram dispostas uma a uma e centralizadas em cada raia a aproximadamente 9,0 cm da borda superior do saquinho. Após semeadura, os

saquinhos contendo as sementes foram dispostos verticalmente dentro de um recipiente plástico de 10,90 x 11,15 cm, contendo 100 mL de água destilada utilizada para o umedecimento do TNT. O recipiente plástico foi previamente tratado com uma solução de hipoclorito de sódio (4 %) por 1 hora.

Posteriormente, 35 desses recipientes contendo os saquinhos com as sementes foram colocados para germinar no frio sob fotoperíodo de 12 h com luz contínua guarnecida por duas lâmpadas luz do dia, fluorescentes de 20 W, a temperatura de $19 \pm 1,6$ °C e umidade relativa do ar em torno de 67 % (Figura 11). A coleta foi realizada em amostras entre 24 aos 30 dias de germinação (DG). Cada amostra consistiu de 1 lote de sementes com 5 repetições de 10 sementes cada.



Figura 11 - Câmara climatizada para germinação das sementes de *R.communis* L. com fotoperíodo de 12 h.

3.1.5. Obtenção de plântulas cultivadas em câmara fria

Após o tratamento de desinfestação de 100 sementes e seleção, 88 sementes viáveis foram colocadas para germinar em bandejas de isopor, em câmara fria (7 m²) e com fotoperíodo de 12 h no campus da Universidade Regional do Cariri, na cidade de Crato/CE.

3.2. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento e medidas de crescimento

O material coletado foi separado para caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento. Foram estabelecidos quatro estádios de desenvolvimento (**EDs**) como proposto por PRISCO (1997) (Quadro 1):

Estádio 0	semente quiescente
Estádio I	semente intumescida
Estádio II	radícula emergida, comprimento até 2 cm
Estádio III	radícula maior que 2 cm e menor que 5 cm
Estádio IV	radícula maior que 5 cm

Quadro 1 - Descrição morfológica dos Estádios de Desenvolvimento de plântulas de mamona (PRISCO, 1997).

Para a realização do trabalho foram escolhidas plântulas nos EDs I até IV. Após o material ter sido separado segundo os EDs, foram efetuadas medidas de comprimento da raiz de plântulas.

3.3. Índice de Desenvolvimento (ID)

Calculou-se o índice de desenvolvimento das Plântulas (ID), com base no tempo de germinação e ED das plântulas, de acordo com PRISCO (1987), segundo fórmula abaixo:

$$ID = \frac{\sum(E_i \times n_i)}{\sum n_i}$$

onde:

E_i = Estádio de Desenvolvimento;

n_i = Número total de sementes ou plântulas com a característica do

Estádio E_i

O experimento–controle envolveu 144 sementes. Após o material ter sido separado segundo os EDs, foram descartadas algumas plântulas deformadas.

3.4. Isolamento da CKX

O isolamento da CKX foi conduzido no laboratório de Bioquímica, Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe onde foram realizados os experimentos.

3.4.1. Preparação da Farinha

Para o preparo da farinha de *R. communis*, *L.* as diversas partes morfológicas das plântulas com 11 dias de germinação foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido e armazenadas em frascos hermeticamente fechados em freezer até uso posterior nas análises de caracterização bioquímica.

3.4.2. Extração de Proteínas

As proteínas solúveis das radículas de *R. communis* *L.* foram extraídas em solução tampão Tris-HCl 0,5 mM pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, na relação de 1:2,5 (farinha/tampão, p/v). A mistura foi mantida sob agitação constante por 2 h a temperatura ambiente. Após isso, foi filtrada em papel de filtro, obtendo-se assim resíduo que foi descartado e sobrenadante denominado de extrato bruto (EB), do qual foi reservada alíquotas para serem utilizadas nos testes de dosagem de proteínas, eletroforese e atividade enzimática.

3.4.3. Fracionamento do Extrato protéico

O sobrenadante obtido no item anterior foi submetido à purificação parcial através de fracionamento com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a 70 % de saturação, segundo procedimento e massas determinadas na tabela de “Ammonium Sulfate Table”, descrito por Green e Hughs (1995).

O sal foi adicionado lentamente sob constante agitação ao extrato e, após a adição, a suspensão foi deixada sob agitação por 1/2 hora em temperatura ambiente e por 12 horas em repouso para que chegasse ao equilíbrio. O material foi levado à centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos sendo separadas as frações obtidas, ou seja, F0-70 e F70 (Figura 12).

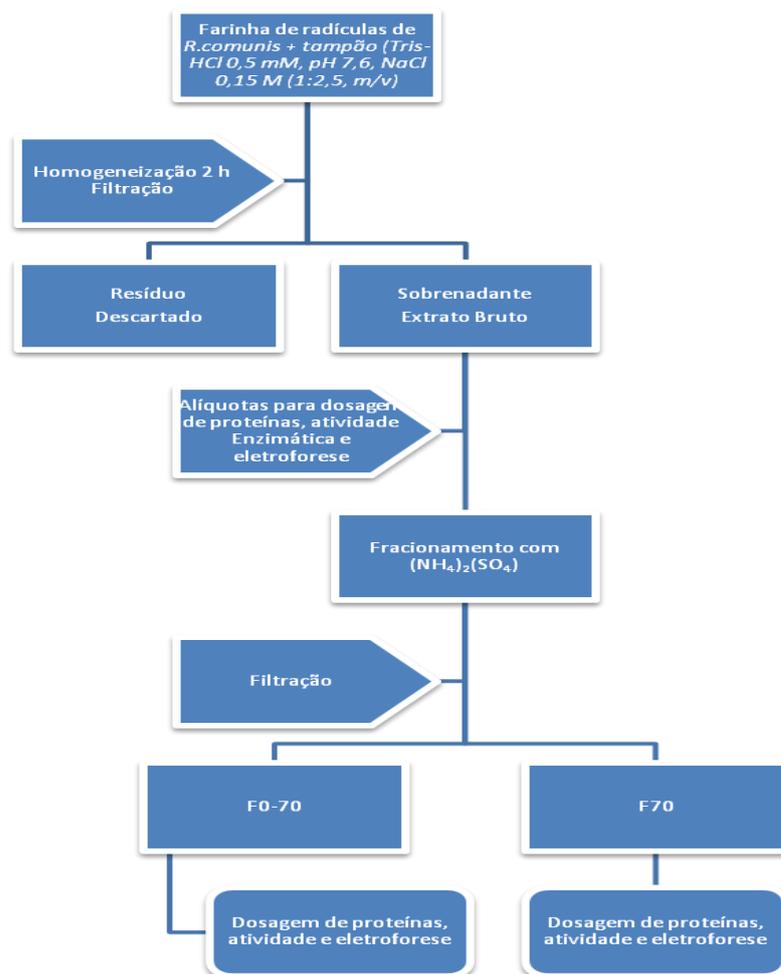


Figura 12 - Esquema de fracionamento salino do extrato protéico de radículas de *R. communis* L. – BRS Energia.

3.4.4. Dosagem de proteínas do extrato bruto e das frações protéicas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) que consiste em técnica para a determinação de proteínas totais utilizando o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01 % (m/v) em solução 10 % de ácido fosfórico (v/v) em etanol (5 %, v/v). Foram adicionados 100 µL da amostra a 2,5 mL da solução de Bradford e realizada leitura das absorvâncias após 3 minutos do início da reação a 595 nm em espectrofotômetro Nova 2100 UV.

A concentração de proteínas do extrato bruto e das frações protéicas de sementes de *R. communis L.* – BRS Energia foi avaliada a partir de curva padrão obtida utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA).

3.4.5. Análise eletroforética do extrato bruto e das frações protéicas

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS do extrato bruto e das frações protéicas de sementes de *R. communis L.* foi realizada seguindo-se a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso em géis de separação em placas verticais. O gel de poliacrilamida continha proporção de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 %. O gel de separação (concentração de 12,5 % de poliacrilamida) foi preparado em tampão Tris-HCl 375 mM pH 8,8 contendo SDS 0,1 %, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (10 %). O gel superior ou de aplicação (stacking gel) foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 5 % em tampão Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 %, persulfato de amônio (10 %) e TEMED concentrado. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas EPS 301 miniVE (Amershan Biosciences).

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 12,0 mM pH 6,8, contendo glicerol (5 %), 0,02 % de azul de bromofenol, 0,4 % de SDS e 2-mercaptoetanol 2,88 mM) e aquecidas a 100 °C por 5,0 minutos. Como tampão de corrida foi utilizado Tris-HCl 2,5 mM, pH 8,3, contendo glicina 19,2 mM e 0,01 % de SDS. A corrida eletroforética foi feita em posição vertical e corrente constante (40 mA) e 200 V durante 1,5 horas. Os marcadores de massa molecular

(GE Healthcare) utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

Após o término da corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,1 % em solução aquosa de sulfato de amônia a 16 % e ácido fosfórico 0,29 M. O excesso de corante foi retirado com água destilada, permitindo a visualização das bandas protéicas a olho nu. A massa molecular aparente da proteína foi determinada através de interpolação do gráfico da mobilidade eletroforética versus a massa molecular das proteínas padrões.

3.4.6. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75

Cromatografia de exclusão molecular foi realizada em coluna de dimensões de 10,1 x 0,93 cm, 50 mL, preenchida com o gel Sephadex G-75 (Sigma), equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M e os sais metálicos $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ a 0,5 M. A eluição das frações protéicas foi seguida por leitura de absorvância em 280 nm lida em espectrofotômetro Nova 2100. Os picos obtidos foram testados quanto a atividade para verificação da presença da CKX.

3.4.7. Cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Agarose

Coluna de ConA-Agarose (Sigma) com 5 mL de gel foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, com $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ 5 mM cada. A eluição das frações protéicas foi seguida por leitura de absorvância em 280 nm lida em espectrofotômetro.

3.4.8. Atividade enzimática

3.4.8.1. Teste de atividade

O teste de atividade oxidante de CKX foi feito de acordo com Libreros-Minotta e Tipton (1995). O ensaio é baseado na formação de uma base de Schiff entre o produto da reação enzimática 3-metil-2-butenal e p-aminofenol. O ensaio é efetivo em faixa de concentração submicromolar e pode ser utilizado em extratos brutos como também em preparações altamente purificadas.

A 460 μL de tampão imidazol 100 mM, pH 7,0, contendo CuCl_2 10 mM são adicionados 40 μL de solução 1mg/mL de isopenteniladenina e 200 μL da amostra. A preparação é incubada a 37 °C por 1 hora. Após a incubação a reação é interrompida pela adição de 300 μL de solução de TCA (ácido tricloroacético) 40 %. A mistura é centrifugada para retirar material protéico em suspensão. A 700 μL do sobrenadante são adicionados 200 μL de p-aminofenol (3 % em TCA 6 %). Após 10 minutos a absorbância é lida.

O branco do ensaio é feito com a substituição da isopenteniladenina por água destilada.

3.4.8.2. Determinação do comprimento de onda utilizado para a leitura do teste de atividade

O volume de 10 μL de 3-metil-2-butenal foi adicionado a 200 μL de solução de p-aminofenol 3 % em TCA 6 %. Após 10 minutos foi efetuada varredura de absorção na faixa de 190-465 nm. O comprimento de onda onde houve maior absorção foi escolhido para as leituras de teste de atividade da CKX.

4. RESULTADOS

4.1. Características de classificação das plântulas nos diversos estádios de desenvolvimento

Os resultados foram obtidos através de três tratamentos diferentes aplicados a germinação das sementes, em câmara climatizada em bandejas e em suporte de TNT, e em condições ambientais em bandejas (Figuras 13 e 14). Dentre estes tratamentos, a situação em condições ambientais, a faixa de temperatura de 30° a 35°C foi a que apresentou as plântulas com suas características morfológicas mais bem definidas, plântulas menos deformadas e com desenvolvimento mais homogêneo entre os indivíduos. As perdas de plântulas causadas por malformações e/ou por fungos foram maiores em câmara climatizada do que em condições ambientais, 59 e 35 plântulas, respectivamente, conforme demonstrado nas Tabelas 2 e 3.

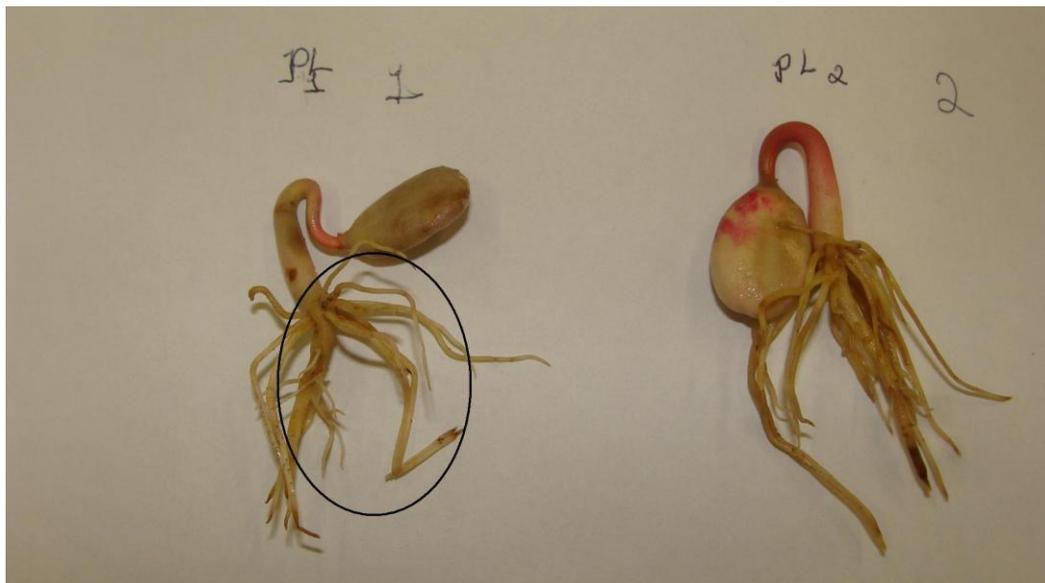


Figura 13 – Radículas de mamona (*Ricinus communis* L., cv BRS Energia), no estágio 3 (radícula maior que 2 cm e menor que 5 cm).



Figura 14 - Radículas de mamona (*Ricinus communis* L., c.v BRS Energia), no estágio 4 (radícula maior que 5 cm).

Tabela 2 - Distribuição em estádios das plântulas de *R.communis* L. cv BRS Energia, durante 11 dias de cultivo em condições ambientais.

Dias de Germinação	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV	Soma de todos os estádios*
1	144				144
2	98	46			144
3	96	44			140
4		122	13		135
5		118	5		123
6			109	11	120
7			95	18	113
8			90	23	113
9			52	59	111
10			5	106	111
11				109	109

* - Houve perdas de plântulas devido a doenças e más-formações.

Tabela 3 - Distribuição em estádios das plântulas de *R.communis* L., cv BRS Energia durante 11 dias de cultivo em câmara climatizada.

Dias de Germinação	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV	Soma de todos os estádios
1	144				144
2	144				144
3		144			144
4		121	13		134
5		117	17		134
6		115	19		134
7		58	70		128
8			98		98
9			70	23	93
10			47	44	91
11			46	39	85

* - Houve perdas de plântulas devido a doenças e más-formações.

As plântulas cujas sementes germinaram no TNT, tiveram o seu sistema radicular afetado, o que impossibilitou a avaliação.

O cultivo em condições ambientais e com 11 dias de germinação levou a condições de maior uniformidade no crescimento das plântulas e, por isso, foi escolhida para a produção da farinha e posterior isolamento da CKX.

4.2. Caracterização Bioquímica

4.2.1. Extração de Proteínas

O extrato bruto obtido a partir da farinha descrita no item 3.4.1 com tampão Tris-HCl 0,5 mM pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, na relação de 1:2,5 (farinha/tampão, p/v) apresentou concentração protéica de 336 mg de proteína por mL de extrato e

atividade de CKX positiva evidenciada pelo teste de atividade oxidante de CKX de acordo com Librerros-Minotta e Tipton (1995).

4.2.2. Fracionamento do Extrato protéico

Como resultado do fracionamento foram obtidas duas frações, F0-70 e F70 que apresentaram, respectivamente, 199 e 140 mg de proteínas por mL. Assim, a maior concentração protéica foi obtida na fração F0-70. Esta mesma fração apresentou atividade, ao contrário da fração F70.

4.2.3. Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75

A F0-70 foi então submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 (Figura 15).

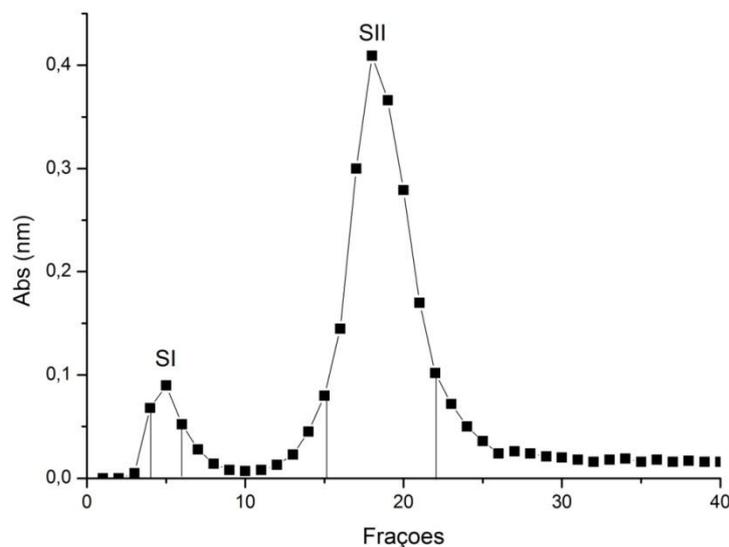


Figura 15 - Perfil de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 (10,1 x 0,93 cm) da F0-70 ressuspensa e eluída no tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M e CaCl₂, MgCl₂ e MnCl₂ 5 mM cada. Volume de amostra aplicada de 3mL; volume da fração 2,2 mL e fluxo de 0,55 mL/min.

O perfil da cromatografia de exclusão molecular evidenciou dois picos, SI e SII, o primeiro dos quais sem atividade. O Pico SII apresentou atividade e as frações 15-22 foram reunidas e aplicadas em coluna de ConA-Sepharose. O pico SI apresentou concentração protéica abaixo do teste de sensibilidade utilizado e o pico SII apresentou 102 mg de proteína por mL de amostra.

4.2.4. Cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Agarose

A cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Agarose apresentou dois picos, o pico não retido, CI e o pico retido CII (Figura 16).

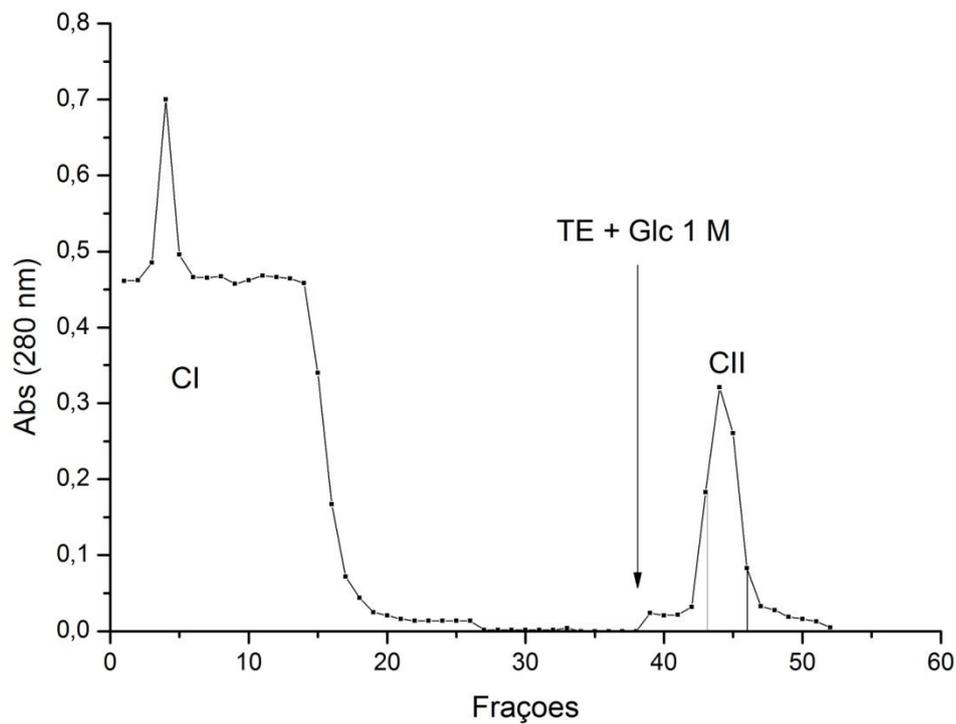


Figura 16 - Perfil cromatográfico da fração SII aplicada em coluna de afinidade ConA-agarose ($V = 5$ mL, frações de 1 mL, fluxo de 1,5 mL/min), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, com $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ 5 mM cada e NaCl 0,15 M. O pico retido (CII) foi eluído com o mesmo tampão acrescido de Glicose 1 M.

As frações 1 a 16 foram reunidas e apresentaram concentração protéica de 87 mg de proteína por mL de solução. Este pico não apresentou atividade.

O pico retido (CII), eluído da coluna com o acréscimo de glicose ao tampão até a concentração final de 1 M, foi coletado e as frações 43-46 reunidas. A concentração protéica desta amostra foi de 10 mg de proteína por mL de solução e apresentou atividade positiva.

4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Eletroforese de alíquotas do extrato total, F0-70, F70, CI e CII está apresentado a seguir (Figura 17).

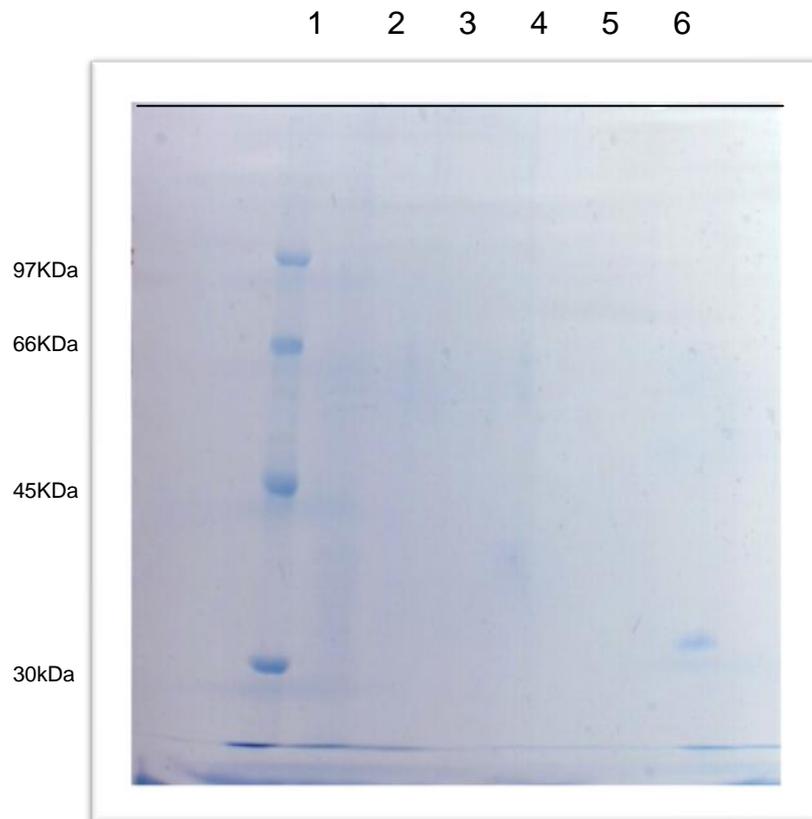


Figura 17 - Eletroforese em Gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS PAGE da fração protéica de raízes de plântulas *Ricinus communis L.*, obtidos a partir das plântulas em condições ambientais. Os marcadores de massa molecular (GE Healthcare) utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Poço 1 – marcadores moleculares; poço 2 - extrato total; poço 3 - F0-70; poço 4 - F70; poço 5 - fração CI e poço 6 - fração CII.

Os poços 2, 3, 4 e 5 não ficaram claros possivelmente pelas amostras estarem muito diluídas. No entanto, o poço 6, onde foi aplicada a amostra CII mostrou uma banda bem resolvida.

Utilizando os marcadores moleculares como padrões, o gráfico Rf x log Mr foi construído e a massa aparente desta banda foi de 31,01 +/- 0,41 kDa (Figura 18).

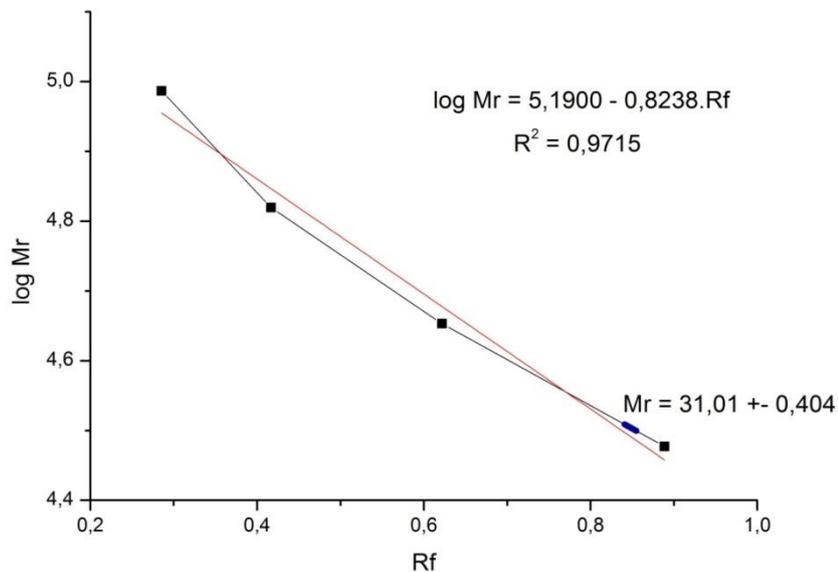


Figura 18 – Gráfico de mobilidade eletroforética *versus* logaritmo da massa molecular aparente dos marcadores eletroforéticos fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa) e da amostra de CII da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-agarose.

4.4. Atividade enzimática

O teste de atividade foi avaliado através da leitura de absorbância em 385 nm. Este comprimento de onda foi escolhido por estar na faixa de comprimentos de onda onde a base de Schiff formada pelo produto da reação da CKX com p-aminofenol absorveu mais fortemente, de acordo com o gráfico de varredura de absorbância apresentado abaixo (Figura 19).

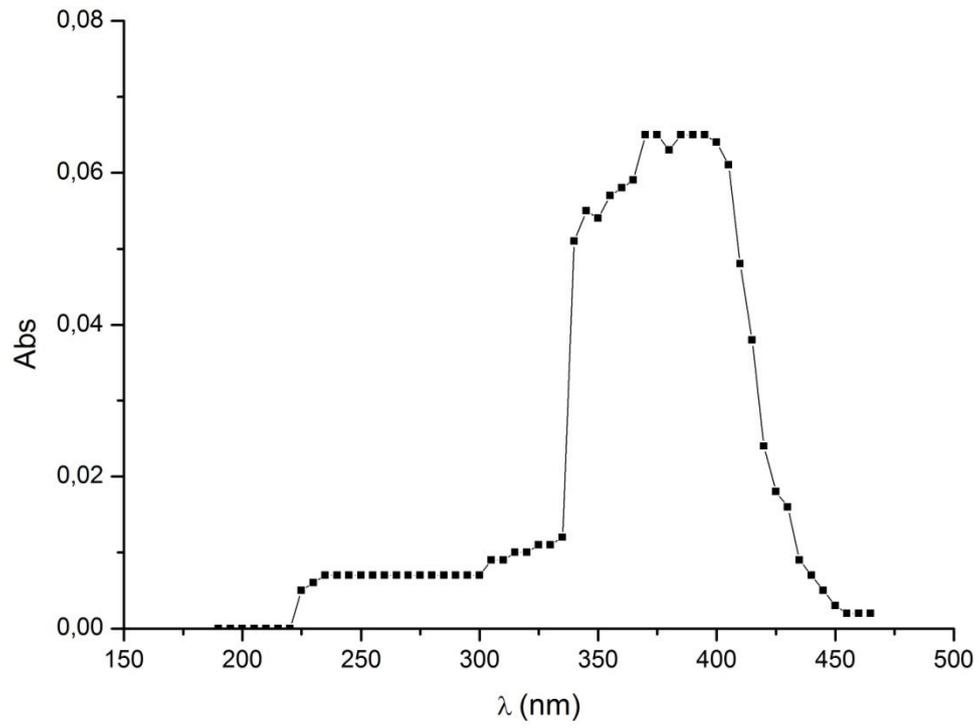


Figura 19 - Varredura da absorvância da base de Schiff formada entre 3-metil-2-butenal e p-aminofenol no tampão da reação citoquinina oxidase.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os Gráficos 1 e 2, parece que a germinação em condições ambientais apresentou o desenvolvimento mais homogêneo das plântulas, do que as germinadas câmara climatizada. No entanto, quando comparados os tratamentos através da Figura 20, verifica-se uma maior dispersão a partir do oitavo dia em câmara fria.

Embora em torno do 6º dia de germinação o desenvolvimento das plântulas em condições ambientais tenham se apresentado muito diverso ($ID > 2,5$), a partir desse dia praticamente todas as plântulas encontravam-se no estágio III e IV e alcançaram o mesmo estágio de desenvolvimento no décimo primeiro dia.

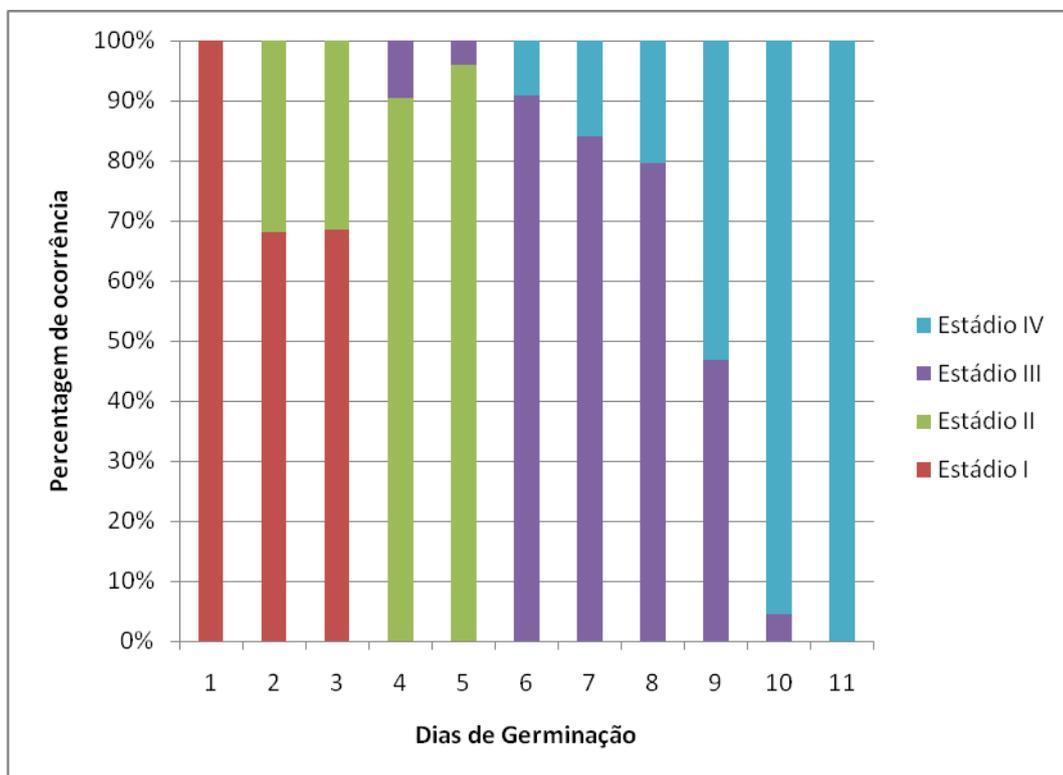


Gráfico 1: Distribuição em estádios das plântulas de *R. communis* L. durante 11 dias de cultivo em condições ambientais

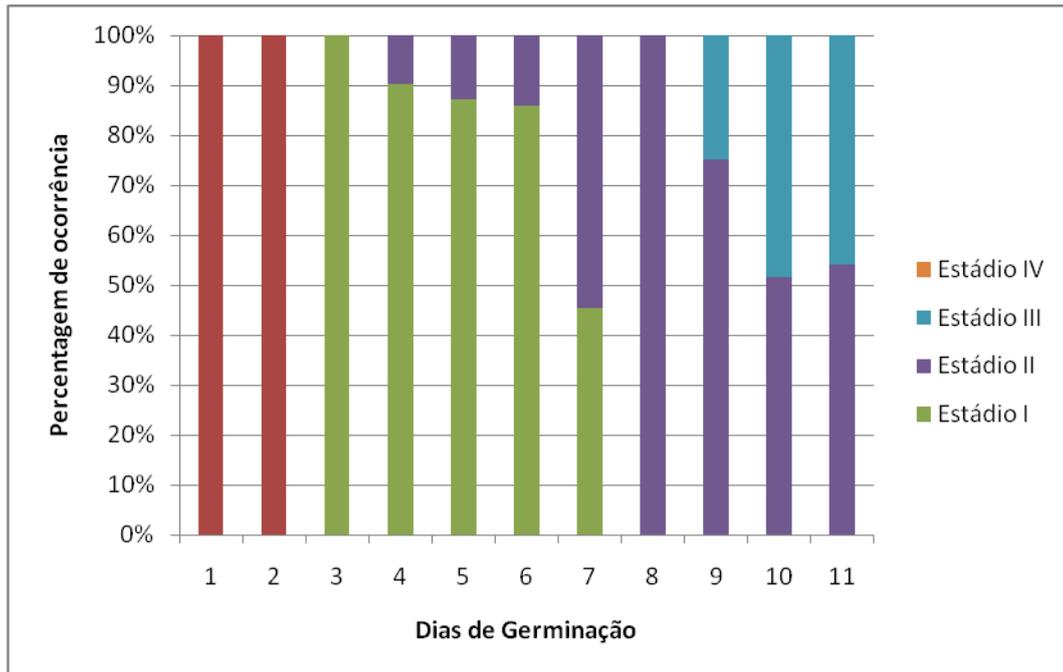


Gráfico 2 - Distribuição em estádios das plântulas de *R. communis* L. durante 11 dias de cultivo em câmara climatizada.

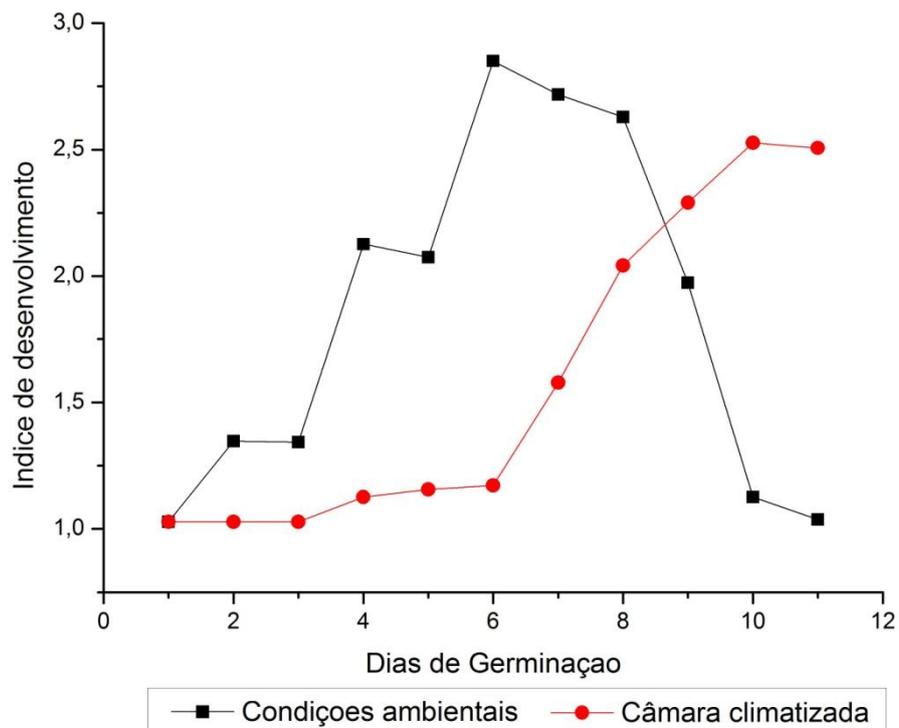


Figura 20 - Distribuição das plântulas nos estádios de desenvolvimento.

Os resultados obtidos são corroborados pelos de Burch e Delouche (1959), os quais verificaram que a velocidade de embebição é maior a 30°C o que, provavelmente, acelerou a germinação, levando todas as plântulas a menor diversidade de estádios.

Observou-se também no tratamento com o TNT, que houve maior infecção por microorganismos nas plântulas e sementes. Também, é provável que o lote de sementes (Popinigis, 1977), a variedade e o tempo de duração do teste, possam ter contribuído para os resultados obtidos, devendo, oportunamente, serem estudados.

Laloue e Fox (1989) purificaram parcialmente a CKX de embrião de germen de trigo (*Triticum aestivum* L.) a partir da fração 35 – 45 % de saturação de sulfato de amônio. Já CKX de *callus* obtidos a partir de hipocótilos de *Phaseolus vulgaris* L. (CHATFIELD e ARMSTRONG, 1986) e de extratos de plântulas de 15 dias de germinação de *Pinus sylvestris* (VALDÉS et al, 2007) se concentraram em frações de saturação de sulfato de amônio mais similares a de radículas de plântulas de mamona, F0-80 e F0-70, respectivamente.

O método de isolamento da CKX foi o mesmo utilizado no isolamento desta enzima de outras fontes como *callus* (CHATFIELD e ARMSTRONG, 1986) e plântulas de *P.vulgaris* (ARAÚJO, 2009), milho (ARMSTRONG, 1994) e tabaco (KAMINEK AND ARMSTRONG, 1990), a cromatografia de afinidade utilizando lectina de *Canavalia ensiformis* imobilizada à matriz. De fato, CKX de várias plantas são glicoproteínas, no entanto, nem todas são glicosiladas.

A enzima recombinante de milho tem oito sítios preditos de glicosilação, cinco deles com probabilidade maior que 50 %. De acordo com análise por espectroscopia de massas, foi indicada a massa de 69 kDa para esta proteína o que sugere a média de dez moléculas de glicose por sítio de glicosilação (MORRIS et al, 1999). De fato, utilizando a sequência de bases de CKX de milho (Houba-Herlin et al, 1999) como modelo para busca de homólogos dentro do genoma de mamona utilizando o programa BLASTn, o resultado obtido, com 44 % de identidade e 59 % de positivos, o *locu* 30131.m007255 (Anexo I). Este gene está anotado como putativo para citocquinina oxidase.

A partir da sequência de aminoácidos traduzida do gene putativo, podem-se prever sete sítios de glicosilação, cinco dos quais com mais de 50 % de probabilidade de ocorrência. No entanto, sua massa molecular calculada através do

programa “Compute pI/Mw” do portal ExPASy Proteomics Server foi de 54,51 kDa, bem maior que a obtida neste trabalho, através de SDS PAGE. Este fato não põe em dúvida os resultados obtidos já que se encontra na literatura indicações de várias CKX com características diferentes e provenientes da mesma planta, e até mesmo tendo o mesmo órgão como fonte. CKXs obtidas de gérmen de trigo e de milho apresentaram as características resumidas no Quadro 2.

Espécie	Fonte	Mr (kDa)	Método de ensaio	pH ótimo	Referência
<i>Triticum aestivum</i>	Gérmen	40	Filtração em gel	7,5	Laloue e Fox, 1989
		78	SDS PAGE		Burch and Horgan, 1989
		60	Filtração em gel	6,5	Galuszka et al., 1998
<i>Zea mays</i>	Sementes	78	SDS PAGE	6,8	Burch and Horgan, 1989
		94,4	Filtração em gel	6,0	McGaw and Horgan, 1983
		88	Filtração em gel	5,0 7,0	Whitty and Hall, 1974
	Plântulas	55 60	Filtração em gel	6,8	Burch and Horgan, 1989
		Proteína recombinante	57,2	Calculada a partir da sequência de DNA	

Quadro 2 - Propriedades de algumas citoquininas oxidases já isoladas. (Modificado a partir de GALUSZKA et al, 1998).

De acordo com estas informações, existem pelo menos duas enzimas CKX aparentemente diferentes no gérmen de trigo, já que apresentaram, além de massa molecular, pH ótimo para atividade também diferente. Já no milho, são três as proteínas diferentes com massas variando entre 78 e 94,4 kDa e pH ótimo na faixa de 5 a 7. Isto abre a possibilidade de que a CKX isolada seja uma proteína diversa àquela codificada pelo gene anotado.

Além disso, existe a ocorrência de diferenças de glicosilação que dão origem a moléculas que apresentam atividades e localizações celulares diversas (Kaminek

and Armstrong, 1990; Motyka e Kaminek, 1994; Zhang et al, 1995; Motyka et al, 1996, 2003). Motyka e colaboradores (2003) demonstraram que a presença da glicosilação na CKX aumenta sua atividade, mas não é imprescindível para esta. Por ser de alta sensibilidade o teste de atividade com a formação da base de Schiff, ficou demonstrado que não existe forma ativa não glicosilada de CKX em plântulas de mamona, ou mesmo formas ativas com glicosilações diferentes de glicose e/ou manose, pois o pico não retido da coluna de ConA-agarose não deu atividade positiva.

CKX isolada parcialmente de plântulas de *P. vulgaris* parece apresentar perfis de glicosilação diferentes (ARAÚJO, 2009) a partir da eluição da coluna de ConA, embora não se podendo, ainda, afirmar serem proteínas iguais ou diferentes. A CKX isolada de plântulas de mamona foi eluída da coluna de afinidade de ConA com alta concentração de glicose (1 M), não dando possibilidade de se perceber se também haveria formas de CKX com diferentes afinidades com a ConA.

De acordo com o perfil eletroforético (Figura 17), o pico retido da coluna de ConA apresentou somente uma banda protéica indicando alto grau de purificação. Na mesma eletroforese não houve clareza na resolução dos outros poços talvez pela diluição destas amostras.

O teste de atividade enzimática nas condições experimentais indicou máximo de absorção na faixa 370-390 nm sendo escolhido o comprimento de 385 nm para as leituras posteriores.

6. CONCLUSÕES

As melhores condições de caracterização morfológica dos diversos estádio de desenvolvimento de plântulas de mamona (*Ricinus communis* L.) encontra-se no ambiente com temperatura entre 30°C a 35°C, definido no tratamento em condições ambientais nesse estudo e com 11 dias de cultivo.

Constatou-se ainda que não existe forma ativa não glicosilada de CKX em plântulas de mamona com onze dias de germinação, ou mesmo formas ativas com glicosilações diferentes de glicose e/ou manose.

A CKX detectada tem glicosilação do tipo com glicose e/ou manose e massa molecular aparente 31KDa.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. M. *et al.* A Produção de mamona no Brasil e o Probiodiesel. In: **Congresso Brasileiro de Mamona, I**, Campina Grande, 2004.
- ANGRA, R, MANDAHAR, C L and GULATI, A. The possible involvement of cytokinins in the pathogenicity of *Helminthosporium maydis*. **Mycopathologia**. 1990, Vol. 199, p. 177-82.
- ARAÚJO, I. M. Caracterização Físico-Química e Bioquímica da semente de *Phaseolus vulgaris* L. (cv. BRS AGRESTE), isolamento e purificação parcial de citoquinina oxidase em raízes de plântulas dessa fabaceae, 2009.
- ARMSTRONG D. J (1994). Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: *MOK, D. W. S.; MOK, M. C.* eds, Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1139-1154.
- ASHIKARI, M, *et al.* 2005. Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production. **Science**. 2005, Vol. 309, p. 741.
- BELTRÃO, N. E. M. *et al.* Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Eds). **O agronegócio da mamona no Brasil**. EMBRAPA, Algodão: Campina Grande: EMBRAPA, 2001, p. 36-61.
- BEWLEY, J D and BLACK, M. 1994. **Seeds: physiology of development and germination**. 2^a. New York: Plenum Press, 1994. p. 445.
- BEWLEY, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9, pp. 1055-1066.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *SEEDS: Physiology of Development and Germination*. 2 ed. New York, Plenum Press, 1994, 445p.
- BILYEU, K D, *et al.* 2001. Molecular and Biochemical Characterization of a Cytokinin Oxidase from Maize. **Plant Physiology**. 2001, Vol. 125, pp. 378-86.
- BORGHETTI, F. (2004). Dormência embrionária. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado* Porto Alegre: Artmed. (pp. 109-124).
- BOWLES, D.J. (1990) Defense related proteins in higher plants. *Biochemistry*, 59 : 837-907.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BUCHANAN, B.B., GRUÍSSEM, W., JONES, R.L. (2000) Biochemistry & Molecular Biology of plants. Editado pelos autores, p: 853.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A.; AIDAR, M. P. (2004). Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado* Porto Alegre: Artmed. (pp. 163-185).

BURCH, A. & DELOUCHE, J. C. Absorption of water by seeds. **Proceedings of the Association Official Seeds Analysts**, 49: 142-150, 1959.

BURCH LR, HORGAN R. 1989. The purification of cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels. *Phytochemistry* **28**: 1313-1319.

CARNEIRO, J. G. A. **Armazenamento de sementes florestais**. Curitiba: FUPEF, 1985. p. 35 (Série técnica, 14).

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. p. 588.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. (2004). Embebição e reativação do metabolismo. In: BORGHETTI, A. F., *Germinação: do básico ao aplicado* Porto Alegre: Artmed. (pp. 149 - 162).

CASTRO, R. D.; VAN LAMMEREN, A. A.; GROOT, S. P.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. (2000). Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiology* , 122, pp. 327-335.

CAVALCANTE, A. P. R.; JACINTO, T. & MACHADO, O. L. T. Methyl jasmonate changes the levels of rubisco and other proteins in *Ricinus communis*. **ACTA Physiologiae Plantarum**, 21: 161-166, 1999.

CHATFIELD, J. M. and ARMSTRONG, D. J. Regulation of Cytokinin Oxidase activity in Callus Tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv Great Northern. **Plant Physiol.** 1986, Vol. 80, pp. 493-99.

CHIERICE, G. O.; NETO, S. C. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Eds.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. EMBRAPA Algodão: Campina Grande: EMBRAPA. 2001. p. 89-120.

CONSTABEL, C.P. & RYAN, C.A (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via octadecanoid defense signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 407-411.

CORRÊA, M. M. **Avaliação da qualidade tecnológica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) de sete cultivares quanto à: absorção de água, tempo de cozimento, hard-shell, e aos teores de ferro e zinco antes e após diferentes métodos de cozimento doméstico.** Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: s.n., 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos, p. 66.

DA SILVA, E. A. *Coffee (Coffea arabica cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation.* Thesis (Ph.D), Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 2000.

DE CASTRO, R. D. and HILHORST, H. W. M. 2000. Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.** 2000, Vol. 12, pp. 105-136.

DELOUCHE, J. C. **Environmental effects on seed development and seed quality.** Hortscience, Alexandria, 1980. v. 15, n. 6, p. 775-780.

DEY, P. M. and HARBONE, J. B. 1997. **Plant Biochemistry.** Londres: Academic Press, 1997.

DIETRICH, J T, *et al.* Changes in cytokinins and cytokinin oxidase activity in developing maize kernels and the effects of exogenous cytokinin on kernel development. **Plant Physiol Biochem.** 1995, Vol. 33, pp. 327-36.

FORNAZIERI-JÚNIOR, A. (1986). Mamona – uma rica fonte de óleo e divisas, Editora Ícone, p : 46.

FREIRE, R. M. M. **Ricinoquímica.** In: AZEVEDO, D. M. P. & LIMA, E. F. (Eds.). O agronegócio da mamona no Brasil. EMBRAPA Algodão: Campina Grande: EMBRAPA, 2001, p.295-335.

GALUSZKA P, SEBELA M, LUHOVA L, ZAJANCOVA L, FREBORT I, STRNAD M, PEC P. 1998. Cytokinins as inhibitors of plant amine oxidase. *J Enz Inhib* **13**: 457-463.

GOLDBERG, R. B., DE PAIVA, G. and YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science.** 1994, Vol. 266, p. 605-614.

GOMES-FILHO, E. & PRISCO, J. T. Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on the proteolytic activity of *Vigna unguiculata* (L.) Savi cotyledons during germination. **Revista Brasileira de Botânica,** 1:83-88, 1978.

GREEN, A. A. & HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic and solvents. **Methods Enzymol.**, 1: 67-90, 1955.

GREEN, T.R. & RYAN, C.A. (1972) Wound induced proteinase inhibitor from tomato leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175: 776-777.

HARADA, J J. Seed maturation and control of germination. In: LARKINS, B. A. and VASIL, I. K. **Cellular and molecular biology of plant seed development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 545-592.

HARE, P. D; VAN STADEN, J. (1994). Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Physiol Plant*, 91: 128-136.

HELDT, H-W. **Plant Biochemistry & Molecular Biology**. London: Oxford University Press, 1997.

HOUBA-HERIN, N. *et al.* Cytokinin oxidase from *Zea mays*: Purification, CDNA cloning and expression in moss protoplasts. **Plant J**. 1999, Vol. 17, pp. 615-626.

IBGE. 2009. IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Produção de cereais, leguminosas e oleaginosas - comparação entre as safras 2008 e 2009 - Brasil**. Disponível em: http://www.ibge.com.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspq_200905_7.shtm. Acesso em: 14/12/2009.

KAMINEK, M; MOTYAKA, V; VANKOVA, R. 1997. Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiol Plant* **101**: 689-700.

KAMINEK, M; ARMSTRONG, D.J. 1990. Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus culture. *Plant Physiol* **93**: 1530-1538.

LABOURIAU, J G. 1983. A germinação de sementes. **Monografias científicas**. Washington: Organização dos Estados Americanos, 1983. p. 170.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-5, 1970.

LALOUE, M. & FOX, J. E. Cytokinin oxidase from wheat: partial purification and general properties. **Plant Physiol**, 90: 899-906, 1989.

LIBREROS-MINOTTA, C. A. & TIPTON, P. A. A colorimetric assay for cytokinin oxidase. **Anal. Biochem.**, 231: 339-341, 1995.

MCGAW B, HORGAN R. 1983. Cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels and *Vinca rosea* crown gall tissue. *Planta* **159**: 30-37.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. p. 107.

MALONE, M. & ALARCON, J. **A influência da idade da planta na indução da ferida de inibidores de proteases em tomate**. *J. Physiologia Plantarum*, 95 (3): 423-427, 1995.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: USP, ESALQ, FEALQ, 2005.

MATTHEWS, S. **Physiology of seed ageing**. Outlook on Agriculture, Elmsford, 1985, v.14, p. 89-94.

MELO, D. L. B. **Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart. Daniel Leão Bandeira de Melo**. Lavras: UFLA, 2005. p. 51.

MICKEY, D. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In: SPRENT, J. I. and MICKEY, D. **Advances in legume systematic 5: the nitrogen factor**. Londres: Royal Botanic Gardens, Kew, 1994, pp. 221-228.

MILLER, C O, *et al.* **Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid**. J. Am. Chem. Soc. 1955, Vol. 77, p. 1392-1393.

MILLS, L. J.; VAN STADEN, J. (1978). Extraction of cytokinins from maize, smut tumors of maize and *Ustilago maydis* cultivares. *Physiol Plant Pathol.*, 13, pp. 73-80.

MOK, M C, *et al.* Cytokinin structure-activity relationships and the metabolism of N6-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine-8-¹⁴C in *Phaseolus vulgaris* callus tissues. **Plant Physiol**. 1982, Vol. 70, pp. 173-178.

MOK, M. C., MOK, D. W. and ARMOSTRONG, D. J. Differential Cytokinin Structure-Activity Relationships in *Phaseolus*. **Plant Physiol**. 1978, Vol. 61, pp. 72-75.

MORRIS, R. *et al.* Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 1999, Vol. 225, p. 328-333.

MOSHKIN, V. A. Growth and development of the plant. In: MOSHKIN, V.A. (Ed). *Castor*. New Delhi: Amerind, 1986. p. 36-42.

MOTYKA V, KAMÍNEK M (1994) Cytokinin oxidase from auxin- and cytokinin-dependent callus cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *J Plant Growth Regul* **13**: 1-9.

MOTYKA V, FAISS M, STRNAD M, KAMÍNEK M, SCHMÜLLING T (1996) Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. *Plant Physiol* **112**: 1035-1043.

MOTYKA, V., VAŇOKOVÁ, R., ČAPKOVÁ, V., PETRÁŠEK, J., KAMÍNEK, M., SCHMÜLLING, T.: Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion.-*Physiol. Plant.* **117**: 11–21, 2003.

MYCZKOWSKI, M. L. **Variabilidade genética para o teor de óleo entre progênes autofecundadas de mamona (*Ricinus communis* L.) da cultivar Guarani.** 2003. 33 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura)–Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

NAMBARA, E. and MARION-POLL, A. 2003. ABA action and interactions in seeds. **Trends in Plant Sciences.** 2003. Vol. 8, p. 213-217.

NODARI, R. O. *et al.* Conservação de frutos e sementes de palmitreiro (*Euterpe edulis* Matius) sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Árvore**, Viçosa, 1998. v. 22, n. 1, p. 1-10.

OBROUCHEVA, N. V. V. The distinct controlling of dormancy release and germination commencement in seeds. In: VIÉMONT, J. D. and CRABBÉ, J. **Dormancy in plants: from whole plant behavior to cellular control.** Wallingford : CABI, 2000, pp. 35-45.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; CALDEIRA, C. M.; SILVA, C. D. & SILVA, D. G. Teste de tetrazólio em sementes de mamona. In: **Teste de tetrazólio em sementes de mamona.** In: II Congresso Brasileiro de Mamona, Aracaju, 2006.

PENG, J.; HARBERD, N. P. (2002). The role of GA-mediated signaling in the control of seed germination. *Current Opinion on Plant Biology*, **5**, pp. 376-81.

POPELKOVÁ, H, *et al.* (2006) Kinetic and chemical analyses of the cytokinin dehydrogenase-catalysed reaction: correlations with the crystal structure. *Biochem J.* Vol. 398, pp. 113-24.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes.** Brasília: AGIPLAN, 1977. 289p.

PRISCO, J. T. *Contribuição ao estudo da fisiologia do estresse salino durante a germinação e estabelecimento da plântula de uma glicófita (Vigna unguiculata (L.) Walp)*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. (Tese de Doutorado), 1987.

RAGHAVAN, V. **Molecular embryology of flowering plants**. New York: Cambridge University, 1997. p. 690.

ROLIM, A. A. B. Óleos vegetais: usos gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 1981. v. 82, n. 7, p.17-22.

RYAN, C.A. & Balls, K.A. (1962) An inhibitor of chymotrypsin from *Solanum tuberosum* and its behavior toward trypsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48:1839-1844.

SAVY FILHO, A. *et al.* **Mamoneira “Guarani”**: **Circular do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 66, 1997.

SCHMÜLLING, T.; WERNER, T.; RIEFLER, M.; KRUPKOVA, E.; BARTRINA, Y.; MANN, I. (2003). Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* 166, 241–252.

SEVAST'YANOVA, L. B. *Botanical and Biological Properties of Castor*. In: MOSKIN, V. A. *Castor*. New Delhi: Amerind: 11-64, 1995.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. M. Mamona: O produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

SHEWRY, P.R. & LUCAS, J.A. (1997) Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology*, 26: 135-192.

TAIZ, L and ZEIGER, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.

TORRES, A C, CALDAS, L S and BUSO, J A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : EMBRAPA – SPI/EMBRAPA CNPH, 1998. p. 864.

VALDÉS, A. E.; GALUSZKA, P.; FERNÁNDEZ, B.; CENTENO, M. L.; FRÉBORT, I. Developmental stage as a possible factor affecting cytokinin content and cytokinin dehydrogenase activity in *Pinus sylvestris*.(2007) *Biologia Plantarum*, **51**:1, 193-197.

VIEIRA, M. G. G. C. **Controle de qualidade de sementes**. Lavras: UFLA; FAEPE, 1999. 113 p.

WHITTY CD, HALL RH. 1974. A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Can J Biochem* **52**: 789-799.

XAVIER-FILHO, F. (1993). Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. UFC-Ceará. Organizações dos Estados Americanos. OEA: 1-31.

YADEGARI, R and GOLDBERG, R B. Embryogenesis in dicotyledonous plants. In: LARKINS, B. A. and VASIL, I. K. **Cellular and molecular biology of plant seed development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 3-52.

ZHANG R, ZHANG X, WANG J, LETHAM DS, MCKINNEY SA, HIGGINS TJV. 1995. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco expressing an *ipt* gene. *Planta* **196**: 84-94.

ANEXOS

Alinhamento da sequência do proteoma do *Ricinus communis* homóloga a sequência de aminoácidos de CKX isolada de milho.

>[30131.m007255](#) Cytokinin dehydrogenase, putative
Length = 530

Score = 1043 (372.2 bits), Expect = 1.9e-106, P = 1.9e-106
Identities = 225/507 (44%), Positives = 301/507 (59%)

```

Query:   17 PASLAALALDGLRXXXXXXXXXXXXXFGNITSALPAAVLYPSSTADLVALLSAA-NSTPG 75
          P+SL L++ G                FGN LP AVL+P S +D+ + P
Sbjct:   40 PSSLKTLSVQGHF--TFDDLHYAAKDFGNRFQLLPFAVLHPRSVSDIATTIKHIWQMGP 97

Query:   76 WPYTIAFRGRGHSMLMQAFAPGGVVVNMSALGDAAAPPRINVSADGR-YVDAGGEQVWID 134
          T+A RG GHSL GQA A GVV+NM SL P++ V A YVD G ++WI+
Sbjct:   98 SDLTVAARGHGHSLHGQAQAHRGVVINMESLQG----PKMQVHAGKHPYVDVSGGELWIN 153

Query:   135 VLRASLARGVAPRSWTDYLYLTVGGTSLNAGISGQAFRHGPQISNVLEMDVITGHGEMVT 194
          +LR SL G+AP+SWTDYL+LTVGGTSLNAG+SGQAFRHGPQISNV +++VITG GE+V
Sbjct:   154 ILRESLKHGLAPKSWTDYLHLTVGGTSLNAGVSGQAFRHGPQISNVHQLEVITGTGEVVN 213

Query:   195 CSKQLNADLFDVAVLGGGLGQFGVITRARIAVEPAPARARWVRLVYTDFAAFSADQERLTAP 254
          CS++ N DLF VGGGLGQFG+ITRARI++EPAP +W+R++Y+DF F+ DQE L +
Sbjct:   214 CSEKQNGDLFHGVLGGGLGQFGIITRARI SLEPAPDMVKWIRVLYSDFNTFARDQESLISA 273

Query:   255 RPGGGGASFGPMSYVEGSVFVNQSLATDLANT--GFFTDADVARIVALAGERNATTVYSI 312
          Y+EG V +N+ T L N F D + A E + T++ +
Sbjct:   274 E-----NTFDYIEGFVIINR---TGLLNWRSSFNPQDPLQ--ASQFESDGRTLFCL 320

Query:   313 EATLNYDNXXXXXXXXVDQELASVLGTLTSYVEGFQFQRDVAYAAFLDRVHGEEVALNKLGL 372
          E + +++E+ ++L L Y+ F +V Y FLDRVH EV L GL
Sbjct:   321 ELAKYFKKDKTK--LNEEIMNLLSQLRYIPSTLFLSEVPYIEFLDRVHVSEVKLRKSKGL 378

Query:   373 WRVPHPWLNMFVPRSRIADFDRGVFKGILQGTDIVGPLIVYPLNKSMDGMSAATPSED 432
          W VPHPWLN+ VP+S+I +F VF IL T GP+++YP+NKS WD+ S P ED
Sbjct:   379 WEVPHPWLNLLVPKSKIHNFAEEVFGNILTDTSN-GPILYIPVNKSKWDNRTSVVIPEED 437

Query:   433 VFYAVSLLFSSV----APNDLARLQEQNRRILRFCDLAGIQYKTYLARHTDRSDWVRHFG 488
          +FY V+ L S+V + L + QNRRIL FCD A + +K YL +T + +W HFG
Sbjct:   438 IFYLVAFLSSAVPSSTGTDGLKHILTQNRRIEFCDTARLGFQYLPHYTSQE EWKAHFG 497

Query:   489 AAKWNRVEMKNKYDPKRLSPGQDIF 515
          +W F + K+ YDP +L+PGQ IF
Sbjct:   498 P-QWKVFAQRKSAYDPLAILAPQRIF 523

```

