

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ATPases EM EXTRATO DE GRÃOS
DE PÓLEN DE *Gossypium hirsutum* E GAVINHA DE *Passiflora* sp**

Jair Pereira da Cunha Júnior

**UBERLÂNDIA - MG
DEZEMBRO - 1996**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ATPases EM EXTRATO DE GRÃOS
DE PÓLEN DE *Gossypium hirsutum* E GAVINHA DE *Passiflora* sp**

Jair Pereira da Cunha Júnior

Monografia apresentada a Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho.

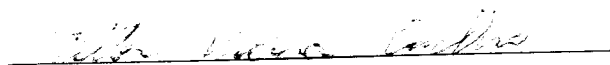
**UBERLÂNDIA - MG
DEZEMBRO / 1996**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

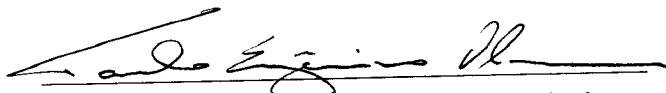
**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ATPases EM EXTRATO DE GRÃOS
DE PÓLEN DE *Gossypium hirsutum* E GAVINHA DE *Passiflora* sp**

Jair Pereira da Cunha Júnior

Aprovada pela Comissão em 04 / 12 / 96. Média 1,00



Prof. Dr. Milton Vieira Coelho
(Orientador)



Prof. Dr. Paulo Eugênio A. M. De Oliveira
(Conselheiro)

Prof. Dra. Maria Inês Homs Brandeburgo
(Conselheira)

Prof. Msc. Nora Ney Santos Barcelos
(Coordenadora do Curso)

Uberlândia, ___ de _____ de _____.

"Tua é, SENHOR, a grandeza, e o poder, a glória, a vitória e a majestade, porque teu é tudo quanto há no céu e na terra, teu é, ó SENHOR, o reino, e tu te exaltaste como chefe sobre todos.

Tanto riquezas como honra vêm de ti, tu dominas sobre tudo, e na tua mão há força e poder; na tua mão está o engrandecer e o dar força a tudo.

Agora, pois, ó nosso DEUS, graças te damos, e louvamos o teu glorioso nome."

I Crônicas 29: 11 a 13

Aos meus pais,

Bárbara da Consolação Cunha e
Jair Pereira da Cunha.

À minha irmã Jane e meu irmão
Jânio, e

Daniela Carrijo Franco.

E aos amigos que compartilharam
a vida na caserna.

AGRADECIMENTOS

O mais sincero agradecimento ao meu orientador Prof. Dr. Milton Vieira Coelho e ao meu co-orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola pela paciência e orientação concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Maria Inês Homs Brandeburgo e pelo apoio e confiança depositada à minha pessoa.

Ao Dr. Paulo Eugênio A. M. de Oliveira pela atenciosa colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos professores do laboratório de Bioquímica (especialmente a Dra. Amélia Hamaguchi) pela amizade e colaboração direta ou indireta na realização deste trabalho.

À funcionária Sebastiana (Tiana) pela amizade e cooperação.

Aos companheiros de curso: Regildo, Denise Dornelo, Waldesse, Kleber, Alexandre Coletto, Elisângela Rosa, Daniel Baldoíno.

A Carlos André pela amizade e companheirismo, especialmente no que se refere ao trabalho de microscopia eletrônica de varredura.

Aos colegas: Fátima, Valéria, Paula, Céci, Ricardo e Dôina pelo apoio e amizade desenvolvidos no decorrer deste período.

A Eddie Lenza de Oliveira, pela identificação das espécies botânicas.

A Edivane Cardoso da Silva, pela atenciosa colaboração na diagramação deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o apoio do CNPq.

ÍNDICE

1. Introdução	01
1.1. O citoesqueleto	02
1.2. Motores moleculares	04
1.2.1. Miosina	04
1.2.2. Cinesina	06
1.2.3. Dineína citoplasmática	07
1.3. Motores moleculares e movimentos vegetais	08
1.4. Descrição botânica da flor de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	09
1.5. A gavinha	11
2. Objetivo	12
3. Metodologia	13
3.1. Crescimento do tubo polínico	14
3.2. Coloração e visualização de grãos de pólen	14
3.2.1. Microscopia óptica de fluorescência	13
3.2.2. Microscopia eletrônica de Varredura	14
3.3. Coleta e obtenção de extrato de grãos de pólen e tubo polínico	15
3.4. Preparação de sobrenadante de gavinha de <i>Passiflora</i> sp	16
3.5. Fracionamento de S3 de gavinha em coluna de DEAE-Sepharose	19
3.6. SDS-PAGE	19
3.7. Dosagem de proteína	20
3.8. Dosagem da atividade ATPásica	20
4. Resultados	22
4.1. Dosagem de proteína e de atividade ATPásica	23
4.2. Germinação e morfologia de grãos de pólen de <i>Gossypium hirsutum</i>	25
4.3. Perfil eletroforético da fração sobrenadante e precipitado de extrato de grãos de pólen e tubo polínico de <i>Gossypium hisutum</i>	25
4.4. Efeito de alta força iônica na atividade Mg ⁺⁺ -ATPásica do sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de <i>Gossypium hirsutum</i>	31
4.5. Efeito de cálcio e calmodulina na atividade Mg ⁺⁺ -ATPásica de sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de <i>Gossypium hirsutum</i>	31

4.6. Efeito de ortovanadato de sódio na atividade Mg^{++} -ATPásica de sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de <i>Gossypium hirsutum</i>	34
4.7. Efeito de íons alumínio e fluoreto de alumínio na atividade Mg^{++} -ATPásica de sobrenadante de extrato de pólen de <i>Gossypium hirsutum</i>	34
4.8. Atividade típica de miosina (K/EDTA-ATPásica) e sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de <i>Gossypium hirsutum</i>	35
4.9. Fracionamento de sobrenadante de gavinha em coluna de DEAE-Sepharose	39
4.10. Efeito de alta força iônica na atividade Mg^{++} -ATPásica do "Pool" DEAE	42
4.11. Efeito de íons cálcio na atividade Mg^{++} -ATPásica do Pool DEAE	42
4.12. Efeito de íons alumínio na atividade Mg^{++} -ATPásica do Pool DEAE	45
4.13. Caracterização da atividade ATPásica ao Pool DEAE-Sepharose	45
5. Discussão	48
6. Referências	54

1. INTRODUÇÃO

É conhecido que as células apresentam amplo grau de motilidade, como, por exemplo, moverem através de substratos, emitir projeções de membranas, realizarem movimentos intracelulares, que na sua maioria são essenciais ao desenvolvimento, crescimento e manutenção celular; bem como de importância para o desempenho de funções especiais em organismos multicelulares.

Essa variedade de movimentos exige um complexo de proteínas filamentosas (citoesqueleto) e a participação de diversas proteínas motoras (motores moleculares). Proteínas motoras são caracterizadas por se ligarem a filamentos de actina ou microtúbulos na ausência de ATP e hidrolisá-lo convertendo parte de sua energia química em força motriz (Warrik e Spudich, 1987; Endow e Titus, 1992).

O conhecimento a respeito da estrutura, função e regulação destas proteínas motoras advêm, principalmente, dos estudos de células animais e de organismos inferiores. Embora sejam detectados sistemas vegetais de alta motilidade como, por exemplo, formação e crescimento do tubo polínico e curvatura da gavinha, existe ainda pouca informação em relação à caracterização bioquímica e ao papel molecular de motores moleculares nestes sistemas.

1.1. O citoesqueleto

As células eucarióticas apresentam três classes principais de fibras do citoesqueleto: a) microtúbulos, constituídos de α e β tubulina; b) microfilamentos que correspondem à F-actina e c) filamentos intermediários.

Microtubulos são estruturas longas com cerca de 100 μm , constituídos de α e β tubulina em forma de tubos com diâmetro interno e externo de 15 e 25 nm, respectivamente. Apresentam uma região organizadora (**microtubule organizing centers-MTOCs**) constituída em parte por γ -tubulina e que

caracteriza o ponto de início da formação da estrutura polimérica (extremidade -), a extremidade oposta (distal) com a capacidade de incorporação de novos monômeros (α e β -tubulina), graças a hidrólise de GTP, é denominada extremidade mais [+] (Figura 01).

São essenciais na organização intracelular, no transporte de vesículas, de grânulos de pigmentos, no movimento de cílios e flagelos e na segregação dos cromossomos, durante processos de divisão celular (Wallin e Stromberg, 1995).

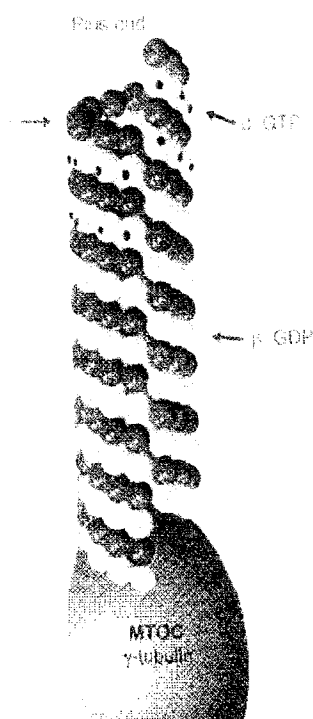


FIGURA 01: Representação esquemática da estrutura de um microtúbulo constituído de α e β tubulina e centro de organização (γ -tubulina).

Adaptação Eckland Mandelkow (1995) *in*: Trends in Cell Biology.

Microfilamentos possuem entre 6 a 7 nm sendo constituídos de filamentos de actina arranjados um em torno do outro. A actina é constituída de uma única cadeia polipeptídica de 375 resíduos de aminoácidos e é

abundante em células na forma despolimerizada (G-actina). Processos de despolimerização e de polimerização de tais moléculas estão intimamente relacionados com modificações morfológicas e divisão celular (Figura 02).

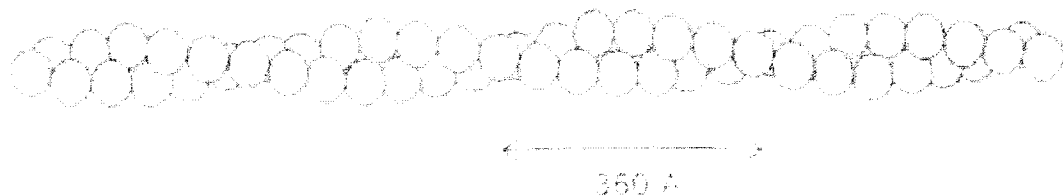


FIGURA 02: Representação esquemática de filamentos de actina.
Adaptado de Lubert Stryer. Bioquímica. 3. Ed. Guanabara (1987).

Os filamentos intermediários são classificados em cinco tipos. Os tipos I e II são constituídos de queratina e encontrados em células epiteliais. O tipo III constitui-se de vimentina, desmina, e outros, enquanto o tipo IV (neurofilamentos) são filamentos típicos de células neuronais. O último, tipo V, são representados pelas laminas (Steinert e Lein, 1990 Apud Patussi, 1996).

1.2. Motores moleculares

Existem três famílias de motores moleculares: Miosina, cinesina e dineína citoplasmática. As miosinas realizam movimentos ao longo de filamentos de actina, enquanto cinesina e dineína utilizam microtúbulos como suporte (Endow e Titus, 1992; Cheney e Mooseker, 1992; Walter e Sheetz, 1993).

1.2.1. Miosina

As miosinas caracterizam-se pela habilidade de interagirem fortemente com F-actina na ausência de ATP e possuir atividade adenosina trifosfatase (ATPásica) estimulada por esta, sob condições fisiológicas (Korn e Hammer,

1988; Cheney et al, 1993). Esta família tem um domínio motor globular amplamente conservado na região N-terminal e ligado a este domínio tem-se diferentes tipos de caudas, região C-terminal.

A primeira proteína desta família a ser estudada foi isolada de músculo esquelético e designada de miosina II ou miosina convencional. A miosina II é constituída de duas cadeias polipeptídeas de aproximadamente 200 kd cada. Estas cadeias constituem-se em dois domínios motores globulares justapostos na extremidade N-terminal, enquanto na porção C-terminal, as mesmas estão unidas entre si produzindo uma estrutura filamentosa (Warrick e Spudich, 1987).

Posteriormente, outra proteína com característica bioquímica similar à miosina II (isolada de *Acanthamoeba*) foi identificada. Embora houvesse similaridade desta nova proteína a miosina II, sua constituição era determinada por uma única cadeia polipeptídica pesada (único domínio motor) e apresentava peso molecular inferior à extraída de músculo esquelético (Pollard e Korn, 1973). Estudos posteriores determinaram a ocorrência de uma proteína similar em intestino de vertebrados (Collins e Borysenko, 1984) e em *Dictyostelium* (Coté et al, 1985). Tal proteína foi denominada de miosina I ou miosina não convencional, em razão da grande homologia encontrada nas sequências de aminoácidos (região N-terminal) com miosina II.

Ultimamente, várias classes de proteínas foram incluídas nesta família, o que se concretizou basicamente pela identificação e dedução, através da sequência de DNA e da estrutura primária do domínio motor destas proteínas. Sob este aspecto, tais proteínas puderam ser classificadas filogeneticamente e representam classes que se estabeleceram em estágios evolutivos distintos.

Os membros desta família desempenham inúmeras funções de importância celular, dentre elas destacam-se: processos de contração muscular,

divisão celular e movimentos intracelulares, especialmente de vesículas e organelas (Espreafico et al, 1992).

1.2.2. Cinesina

A cinesina possui aproximadamente 360 kd e consiste de duas cadeias pesadas entre 110 e 130 kd e duas cadeias leves de 60 e 70 kd (Kuznetsov et al, 1988; Bloom et al, 1988). A cadeia pesada é segmentada e pode ser dividida em três domínios; um domínio globular (domínio motor) que apresenta sítios ligantes de ATP e microtúbulos. Esse domínio é responsável pela função mecanoquímica da molécula (Scholey et al, 1989). Um segundo domínio, que é o responsável pela dimerização da molécula (Yang et al, 1989) apresenta-se constituído de uma super hélice de α -hélice. O terceiro domínio é uma região, geralmente carregada positivamente (C-terminal), que contém sítios ligantes para cadeias leves (Hirokawa et al, 1989) e parece exercer um papel de elemento de regulação na atividade motora da molécula. Semelhante às miosinas, a região domínio motor da proteína é amplamente conservada, enquanto as regiões não motoras possuem baixa homologia nas sequências de aminoácidos.

Evidências indicam que cinesinas são ATPases motoras responsáveis pelo transporte de organelas e vesículas dirigidas para a extremidade (+) de microtúbulos, ou seja, transporte dirigido para as extremidades de “crescimento” dos microtúbulos. Estudos do transporte de vesículas em células, em extrato celular e em dispersão de pigmentos, demonstram que há supressão deste transporte especializado (para a extremidade +), quando estes sistemas são tratados com anticorpos específicos para cinesina (Vale et al, 1985; Blady et al, 1990; Bomsei et al, 1990; Rodionov et al, 1991).

1.2.3. Dineína citoplasmática

A dineína citoplasmática foi identificada inicialmente em ovos de ouriço do mar (Weisenberg e Taylor, 1963), e apresenta-se amplamente distribuída na natureza. A molécula possui aproximadamente 1200 kd, sendo formada por um complexo de multisubunidades constituídas por duas cadeias em torno de 400 kd, duas a três cadeias intermediárias entre 70 e 74 kd e um número variável de cadeias leves entre 40 e 60 kd (Paschal et al, 1987; Schroer et al, 1989). As duas cadeias pesadas são semelhantes e possuem um domínio globular e extremidade amino terminal (Valle et al, 1988).

A dineína possui alta afinidade por microtúbulos na ausência de ATP e possui atividade motora dirigida para a extremidade (-) de microtúbulos. Apesar da dineína possuir a capacidade de hidrolizar outros nucleotídeos trifosfatado, somente a hidrólise de ATP é estimulada por microtúbulos e suporta a realização de força motriz (Ley et al, 1987; Paschal et al, 1987).

Estudos revelam que a dineína citoplasmática está presente em vesículas sinápticas purificadas, e que, ocorre um alto grau de especificidade entre interação vesícula-dineína. Esta associação, não pode ser revertida pela presença de ATP, sugerindo que, a região de interação com a vesícula não compreende o domínio motor.

A dineína citoplasmática parece estar envolvida no transporte de organelas dirigidas para a extremidade (-) em neurônios e no transporte de cromossomos de células em divisão (Walker e Sheetz, 1993).

1.3. Motores moleculares e movimentos vegetais

O tubo polínico é uma estrutura que tem sua origem em um dos constituintes bicelulares do gametófito masculino: a célula do tubo. O tubo polínico exerce importante função na reprodução das fanerógamas (vegetais superiores), uma vez que representa o elemento de condução dos núcleos espermáticos até o gametófito feminino .

O tubo polínico possui tanto aparato citoesquelético constituído de actina (Taylor, 1989) quanto de microtúbulos (Heslop-Harrison, 1988); bem como também motores moleculares que realizam movimentos ao longo de proteínas do citoesqueleto (Tang 1989; Tiezze e Moscatelli, 1992). Anticorpos específicos para miosina reconhecem, em Western Blotting, uma proteína relacionada a esse motor molecular em tubo polínico de *Nicotiana sp* e estudos de imunofluorescência sugerem que tal proteína esteja associada às superfícies de organelas e núcleos espermáticos (Tang, 1989). Recentemente, foi mostrado que anticorpo específico para cinesina reconhece dois polipeptídeos (108/100 kd) de tubos polínicos de *Nicotiana tabacum* e técnica de imunofluorescência mostra o acúmulo de cinesina na região apical do tubo polínico e superfícies de vesículas (Tiezzi e Moscatelli, 1992).

A gavinha apresenta um movimento típico de curvatura, que é um processo altamente dependente da hidrólise de ATP (Jafe e Galston, 1966 apud Yong-Ze e Yen, 1989). Yong-Ze (1989) identificou actina e miosina em gavinha de ervilha sugerindo que tais eventos de curvatura são dependente de sistema actomiosina.

1.4. Descrição Botânica da Flor de algodão (*Gossypium hirsutum*).

A flor é o aparelho de reprodução sexuada dos vegetais superiores. Uma flor completa é formada por quatro conjuntos de peças florais, bem distintos (verticílios), estes conjuntos recebem as seguintes denominações: **cálice** (conjunto de sépalas), **corola** (conjunto de pétalas), **androceu** (aparelho reprodutor masculino) e **pistilo ou gineceu** (aparelho reprodutor feminino).

No caso de *Gossypium hirsutum*, as flores são completas (apresentam todos os quatro verticílios) e hermafroditas (tanto abrigam o aparelho reprodutor feminino quanto masculino). O cálice, o verticílio floral mais externo é um órgão reduzido e de proteção, apresentando cinco sépalas unidas e truncadas. A corola é formada por cinco pétalas separadas que apresentam coloração variando de branco creme a amarelo. O androceu caracteriza-se por constituir uma coluna estaminal que parte do ovário até a região estigmática (estigma: parte superior do aparelho reprodutor feminino que recebe os grãos de pólen). Os filetes (3 a 6 mm), ligados cada um a uma antera, estão alinhados em cinco linhas duplas, longitudinais e pouco nítidas. As anteras (estruturas que resguardam os grãos de pólen) são providas de duas bolsas riniformes e se prendem ao filete pela parte central (Kassab, 1986).

Os grãos de pólen são bem característicos, geralmente esféricos de coloração amarelada com espículas bem evidentes, típicas da família Malvaceae. O pistilo compõe-se de um ovário, um estilete longo e um estigma tripartido curto (Kassab, 1986).

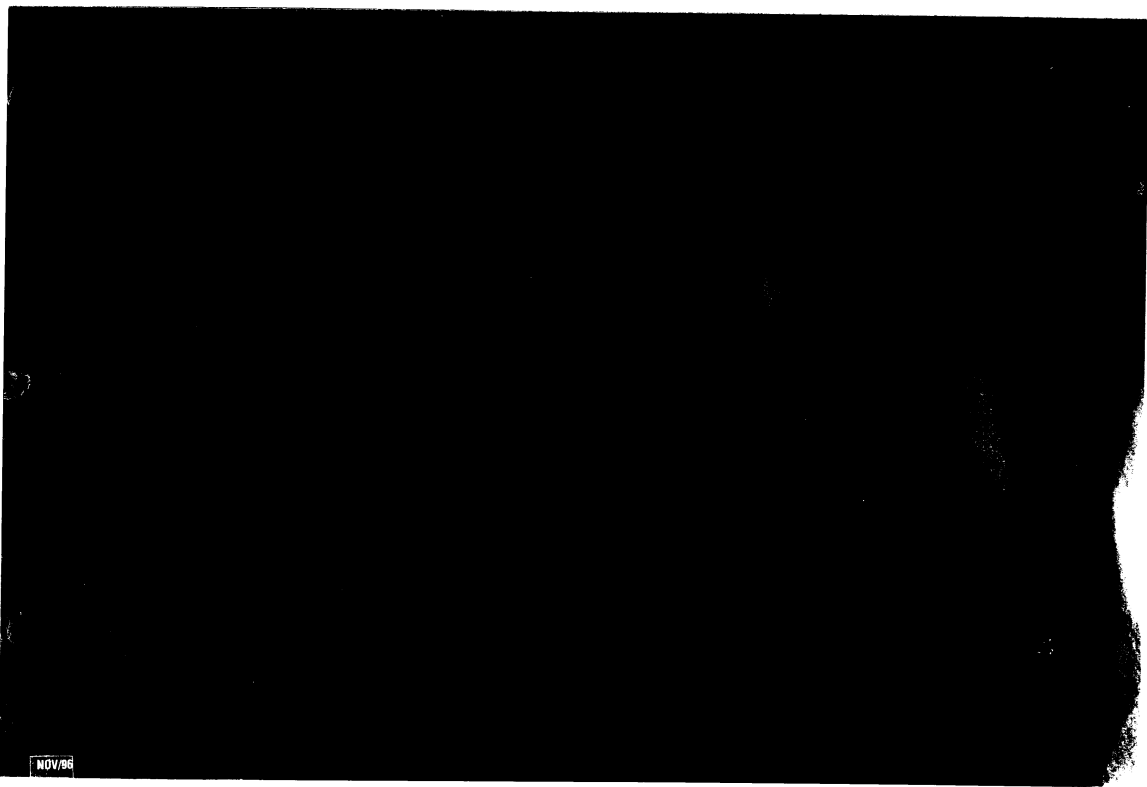


FIGURA 03: Flor de *Gossypium hirsutum*.

1.5. A gavinha.

A gavinha é um apêndice geralmente curvo, fino e dinâmico que basicamente corresponde em arquitetura tecidual à estrutura foliar ou caulinar (figura 04).

Esse apêndice fundamentalmente exerce a função de elemento de propagação vegetativa, uma vez que representa a entidade de alongamento e fixação do vegetal aos mais diversos substratos.



FIGURA 04: Gavinha de *Passiflora sp.*

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar parcialmente a atividade ATPásica de grão de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum* e gavinha de *Passiflora sp*, como indicativo preliminar da presença de motores moleculares nestas estruturas. Também foi de nosso interesse o estudo inicial, do ponto estrutural e morfológico, do grão de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*.

3. METODOLOGIA

3.1. Crescimento do tubo polínico.

Os grãos de pólen de *Gossypium hirsutum* foram depositados sobre placas de vidro (130 cm²) (grãos de pólen de duas flores, para cada placa) recobertas por celofane umidecido previamente com meio de germinação (Sacarose 10%, Cloreto de Cálcio 2,5 mM, Cloreto de Magnésio 2,5 mM, pH 6,8). Para a germinação, os grãos de pólen foram expostos, durante 1 hora à luz (quatro lâmpadas fluorescentes) e colocados em câmara úmida por 60 minutos. A temperatura local variou de 27 °C a 30 °C.

Para a avaliação de crescimento de tubo polínico foi contado o porcentual de formação em 50 pequenas áreas de 0,14 cm², o que corresponde a 5% da área total da placa. Através destas amostragens foi deduzido a porcentagem total de germinação para cada espécie.

3.2 . Coloração e visualização de grãos de pólen.

3.2.1. Microscopia Óptica de Fluorescência.

Os grãos de pólen e tubos polínicos foram corados diretamente com solução corante constituída de azul de anilina 0,1% e K₂PO₄ 0,1 M. A solução corante complexa-se, essencialmente com depósitos de calose (depositada sobre o grão de pólen ou como parte de "plugues" citoplasmáticos, a nível de tubo polínico) produzindo intensa fluorescência quando esposta a luz ultravioleta.

Para a coloração *in vivo*, grãos de pólen e tubos polínicos presente em pistilos (aparelho reprodutor feminino), foram fixados em álcool 70% (48 horas) e sofreram pré-tratamento, com NaOH 9 N, durante 15 minutos a 60 °C.

Após o pré-tratamento os pistilos foram lavados em água deionizada (para retirada do NaOH) e submetidos a imersão em solução corante.

A microscopia desenvolveu-se em microscópio de epifluorescência, com iluminação em luz ultra-violeta com filtro na faixa de 450 nm (Martin, 1959).

3.2.2. Microscopia de Varredura.

Os grãos de pólen foram fixados “overnight” em solução fixadora (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%) tamponado com tampão C (cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2). Após a fixação, foram lavados em tampão C.

Os grãos de pólen foram aderidos em película poli-lisina 0,1% em TBS (15 minutos) e novamente lavados em tampão C. Os grãos de pólen aderidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, tamponado em tampão C, por duas horas. Posteriormente, receberam nova lavagem em tampão C.

Os grãos de pólen (aderidos e lavados), foram desidratados sucessivamente em bateria de acetona (1X 30%, 50%, 70%, 90% e 2x 100%), por quinze minutos cada. Seguida a desidratação por acetona, os grãos de pólen foram levados ao ponto crítico. Ultimamente, receberam banho de ouro puerizado (180 segundos).

A visualização foi desenvolvida em microscópio Geol.

3.3. Coleta e obtenção do extrato de pólen e tubo polínico.

Pólenes germinados e não germinados (de duas flores) de *Gossypium hirsutum* foram coletados pela adição, em cada placa, de 500 µl de tampão TC (Imidazol-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, Benzamidina 1mM, PMSF 0,3 mM). Sendo que o coletado foi homogeneizado em TC acrescido de 5 mM de ATP, submetido a centrifugação 8.000 x g por 20

minutos à 4 °C. Posteriormente, tanto o sobrenadante quanto a fração particulada resultantes da centrifugação foram submetidas a diálise contra tampão TD (Imidazol-HCl 20 mM pH 8.0, DTT 0,1mM e EDTA 0,1 mM) para retirada de ATP (Esquema 01).

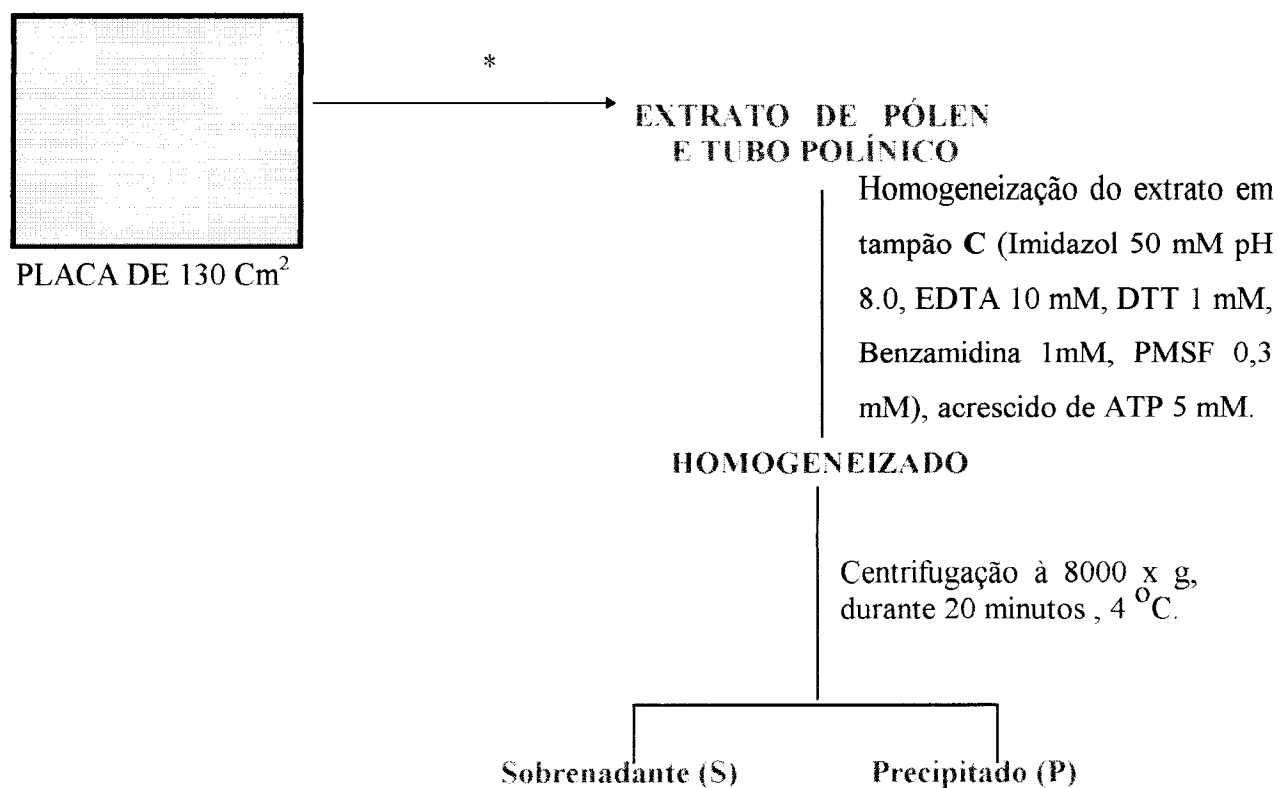
3.4. Preparação de Sobrenadante de Gavinha de *Passiflora sp.*

As gavinhas foram coletadas em solução salina a temperatura de 2 °C. Em seguida, foram homogeneizadas em tampão de extração T. E. (Imidazol-HCl 50 mM pH 7.2, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 1 mM e PMSF 0,3 mM); na proporção de 2 ml de Tampão para cada grama de gavinha.

O homogeneizado foi filtrado em gaze e posteriormente sofreu centrifugação a 38.900 x g durante 40 minutos, a 4 °C. Ao sobrenadante (S1) acrescenta-se sulfato de amônio a 30% de saturação, sob agitação em banho de gelo, seguido de nova centrifugação a 34.000 x g por 20 minutos, 4 °C.

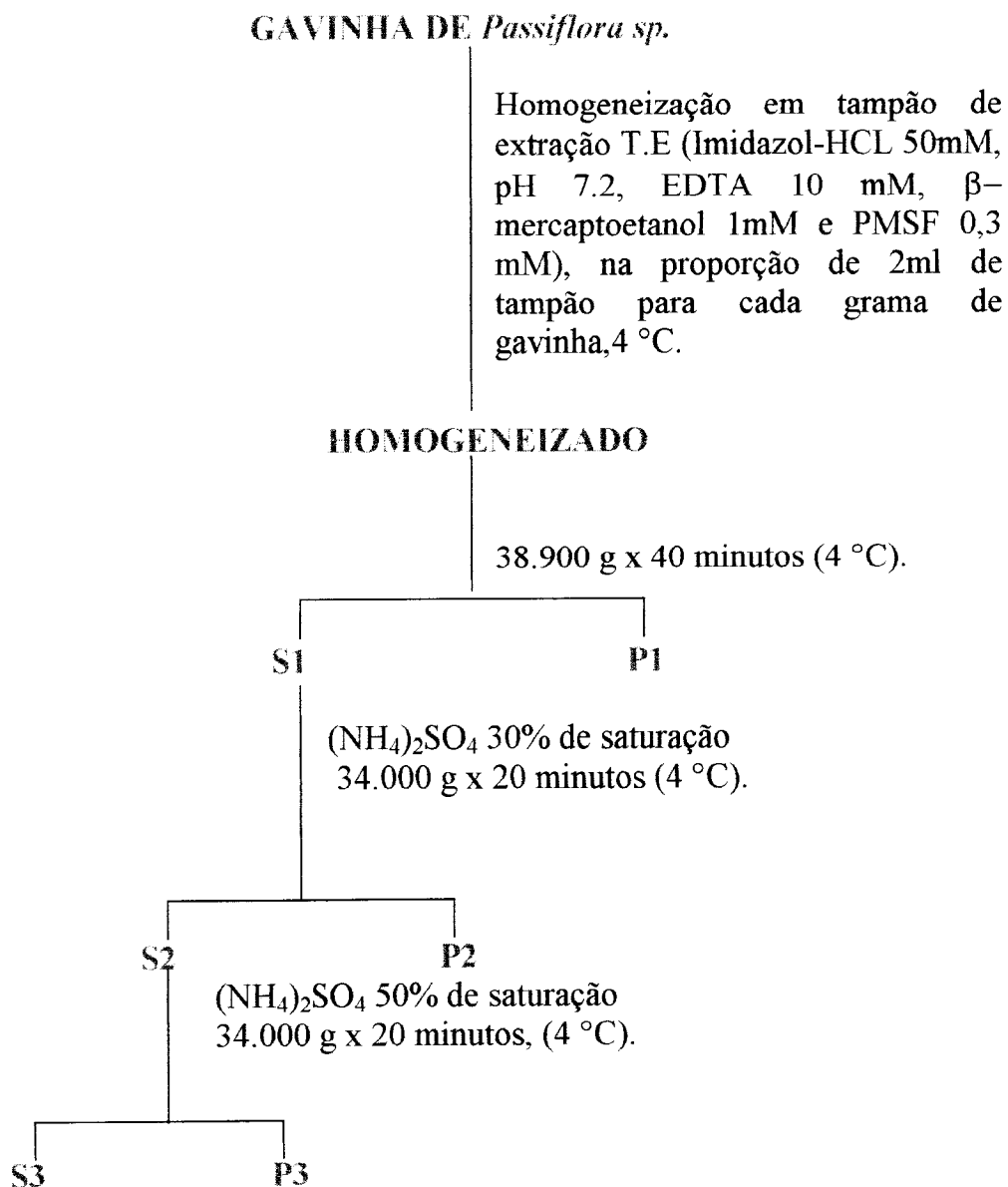
O sobrenadante resultante (S2) foi submetido a novo tratamento, sob as mesmas condições, com sal a 50% de saturação e centrifugado à 34.000 x g durante 20 minutos, 4 °C. O sobrenadante (S3) foi coletado e mantido a 4 °C (Esquema 02).

ESQUEMA 01: Preparação de sobrenadante de extrato de Pólen e Tubo polínico de *Gossypium hirsutum*.



* Pólens germinados e não germinados foram coletados pela adição de 500 µl de tampão C.

ESQUEMA 02: Preparação e Fracionamento de Sobrenadante de gavinha de *Passiflora sp.*



3.5. Fracionamento de S3 de Gavinha em Coluna de DEAE-Sepharose.

A Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose desenvolveu-se em câmara fria, a uma temperatura média de 6 °C e o perfil cromatográfico foi acompanhado através da absorvância a 280 nm.

A coluna (10 ml de resina) foi previamente equilibrada com 10 volumes de tampão de equilíbrio (Imidazol-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0,1 mM e DTT 0,1mM). O sobrenadante **S3** (25 ml) foi aplicado em DEAE-Sepharose com fluxo de 10 gotas por minutos. Posteriormente à aplicação, a coluna foi lavada com o próprio tampão de equilíbrio.

Proteínas retidas foram eluidas em tampão Imidazol-HCl 10 mM pH 7.2, EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM, em gradiente de 0-300 mM de NaCl, seguida de eluição com 600 mM de NaCl.

3.6. SDS-PAGE

Os perfis de polipeptídeos, obtido a partir de gavinha ou de extrato do pólen e tubo polínicos, foi analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando o sistema com tampão descontínuo descrito por Laemmli (1970) e sistemas de placas empregado por Studier (1973).

O gel de separação foi preparado com Tris-HCl 375 mM pH 8.8, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1 %, EDTA 2 mM, acrilamida: bisacrilamida (30:8) TEMED 0,05% e persulfato de amônio 0,35%. O volume de acrilamida:bisacrilamida utilizada foi determinada pela concentração desejada do gel (12%). O gel de empilhamento foi preparado com Tris-HCl 125 mM pH 6.8, EDTA 2mM, SDS 0,1%, acrilamida:bisacrilamida 5%, TEMED 0,12% e persulfato de amônio 0,12%.

O tampão eletrodo inferior utilizado contém: Tris-HCl 100 mM pH 8.3, EDTA 7.8 mM, SDS 0,3% e o superior além dos constituintes citados ainda apresenta glicina 0,77 M

A 100 µl de amostra foi adicionado 50 µl de solução STOP (Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, SDS 1%, azul de bromofenol 0,25% e glicerol 10%). Posteriormente, a mistura recebeu 10 µl de β-mercaptoetanol e foi aquecida em água fervente por dois minutos. A “corrida” desenvolveu-se a 20 mA. Os geis foram corados com Coomassie Blue (R-250).

3.7. Dosagem de Proteínas

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford. Para a conversão da absorbância em concentração de proteína foi utilizada uma curva padrão de soro albumina bovina (Bradford, 1976).

As dosagens foram feitas em duplicatas e em cada experimento confeccionou-se nova curva padrão (BSA).

3.8. Dosagem da atividade ATPásica

A atividade ATPásica foi determinada por meio da medida do fosfato inorgânico (Pi) liberado da hidrólise de ATP, através da dosagem colorimétrica desenvolvida por Heinonen e Lahti (1981).

A reação foi iniciada com ATP 1 mM, sob incubação de 15 a 30 minutos à 37 °C. A reação foi finalizada com a própria solução de dosagem (dois volumes de acetona PA, um de molibdato de amônia 10 mM e um de ácido sulfúrico 5 N), seguido de adição de 200 µl de ácido cítrico 1 M (quinze segundos após ao acrescimento da solução de dosagem). O ácido cítrico adicionado tem a função de complexar com o molibdato livre.

As determinações foram feitas em duplicatas para cada experimento e foi utilizado a média de cinco melhores dosagens como resultado.

Atividade ATPásica	MgCl ₂ 5 mM	CaCl ₂ 3,2 mM	KCl 60 mM	KCl 600 mM	EDTA 2 mM
Mg ⁺⁺	X				
Ca ⁺⁺		X			
↓ K-EDTA			X		X
↑ K-EDTA				X	X

O meio de reação para Mg⁺⁺-ATPase e Ca⁺⁺-ATPase contém Imidazol-HCl 25 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, DTT 1 mM e MgCl₂ 5 mM ou CaCl₂ 3,2 mM. A K/EDTA-ATPase foi desenvolvida em meio de reação contendo Imidazol 25 mM pH 8.0, EDTA 0,5 mM, DTT 0,2 mM.

4. RESULTADOS

4.1. Dosagem de proteína e da atividade ATPásica

Para a conversão da absorbância em concentração de proteína ou concentração de fosfato, foram confeccionadas curvas de concentrações conhecidas destes compostos conforme descrito em material e métodos; e as respectivas absorbâncias foram acompanhadas a 595 nm e 355 nm (Figuras 5 e 6).

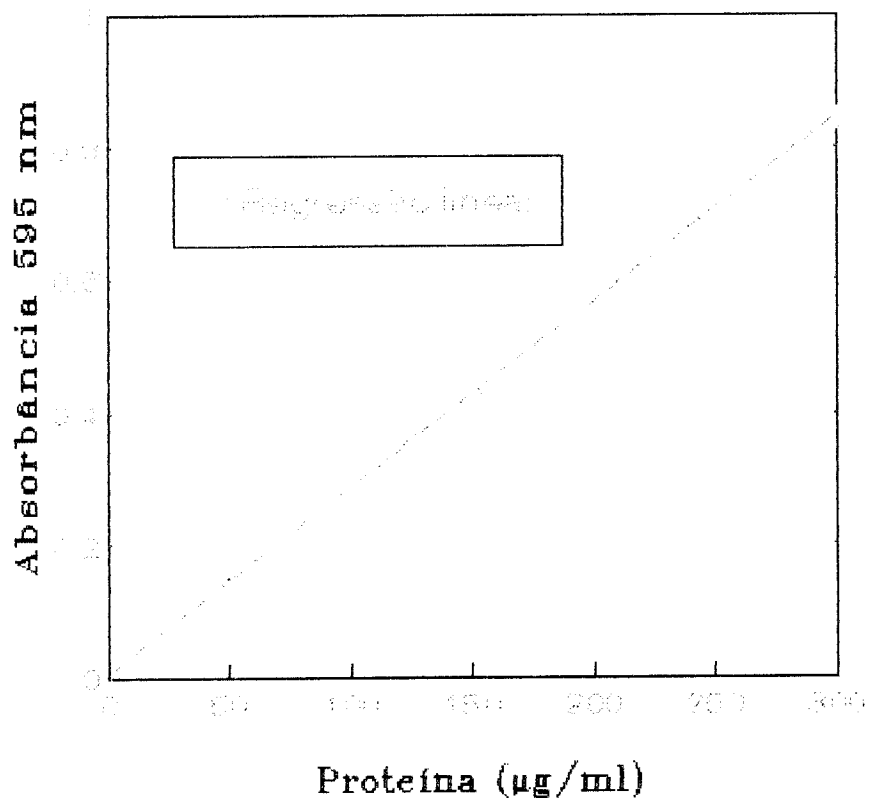


FIGURA 05: Curva de Soro Albumina Bovina (BSA).

Curva confeccionada com soro albumina bovina, utilizada para conversão da absorbância (595nm) em concentração de proteína.

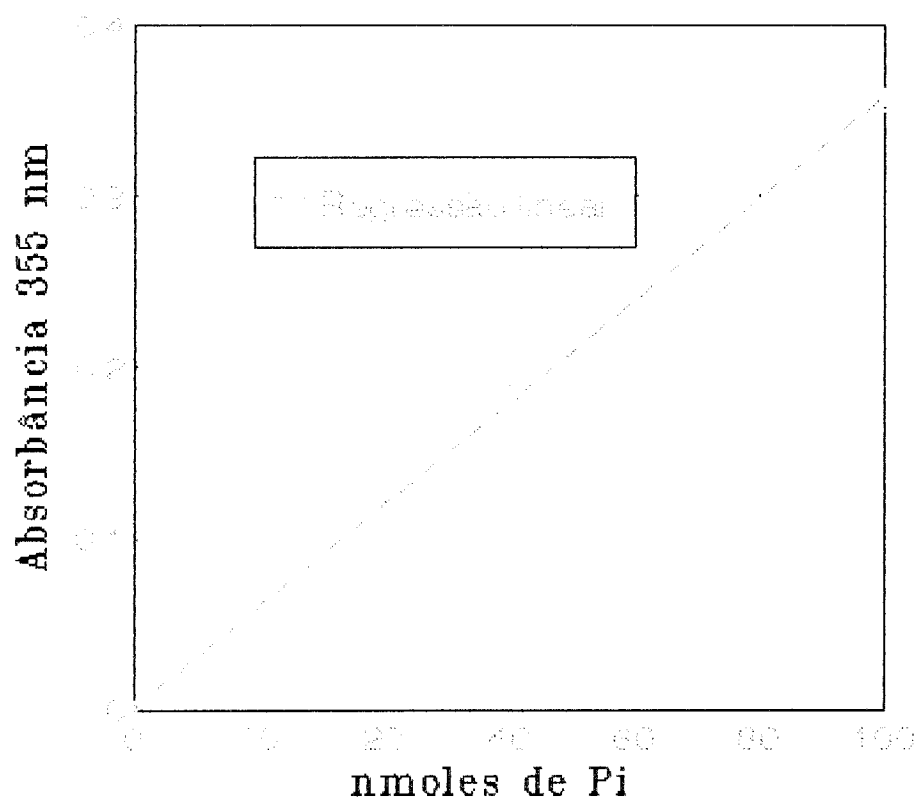


FIGURA 06: Curva padrão de fosfato inorgânico.

Curva confeccionada com KH_2PO_4 (2 mM) e utilizada para determinação da quantidade de fosfato liberado na hidrólise do ATP.

4.2. Germinação e morfologia de grãos de pólen de *Gossypium hirsutum*

No sentido de otimizar as condições ideais para a formação e crescimento de tubo polínico de grãos de pólen de *Gossypium hirsutum* (algodão), realizamos uma série de ensaios. Esses nos possibilitaram a descoberta de um sistema simples para a germinação, onde a utilização de placas de vidro recobertas com celofane, previamente umedecidas com solução de germinação, produziram, sob nossas condições, um percentual de germinação superior à 60% para esta espécie (figura 07).

Ainda, como a necessidade de se reconhecer grão de pólen e tubo polínico, do ponto de vista morfológico e estrutural, realizamos ensaios de visualização tanto a nível de microscopia óptica como eletrônica. Os estudos de microscopia de fluorescência nos revelaram grãos de pólen e tubos polínicos exuberantes, especialmente aqueles germinados *in vivo* (Figura 09). A microscopia eletrônica de Varredura do grão de pólen revela um pólen grande, com diâmetro médio de aproximadamente 80 μm , com exina ornamentada por múltiplas espículas de comprimento variando entre 9-13 μm , sob bases dilatadas (figura 10).

4.3. Perfil eletroforético da fração sobrenadante e precipitado de extrato de grãos de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*

Na análise eletroforética da fração sobrenadante (S) e precipitado (P) do pólen de *Gossypium hirsutum* observa-se um predomínio de peptídeos na fração S quando comparado à fração P. Essencialmente, os peptídeos pertencentes a essas frações não apresentam o peso molecular superior a 97 kd (Figura 11).

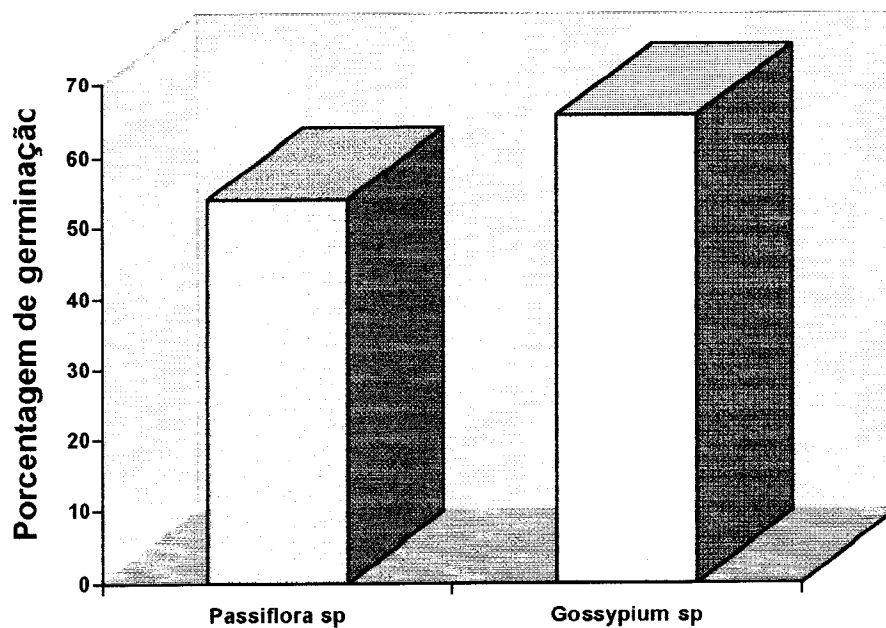


FIGURA 07: Porcentagem de germinação de grãos de pólen de *Gossypium hirsutum* e *Passiflora sp.*

Os grãos de pólen foram germinados em meio de germinação: Sacarose 10%, Cloreto de Cálcio 2,5 mM, Cloreto de Magnésio 2,5 mM, pH 6,8; colocados em câmara úmida e expostos à luz por 1 hora (quatro lâmpadas fluorescentes). A temperatura local média foi de 29° C.



FIGURA 08: Flor e folhas de *Gossypium hirsutum* (Malvaceae).
Flor de *Gossypium hirsutum* em arbusto.

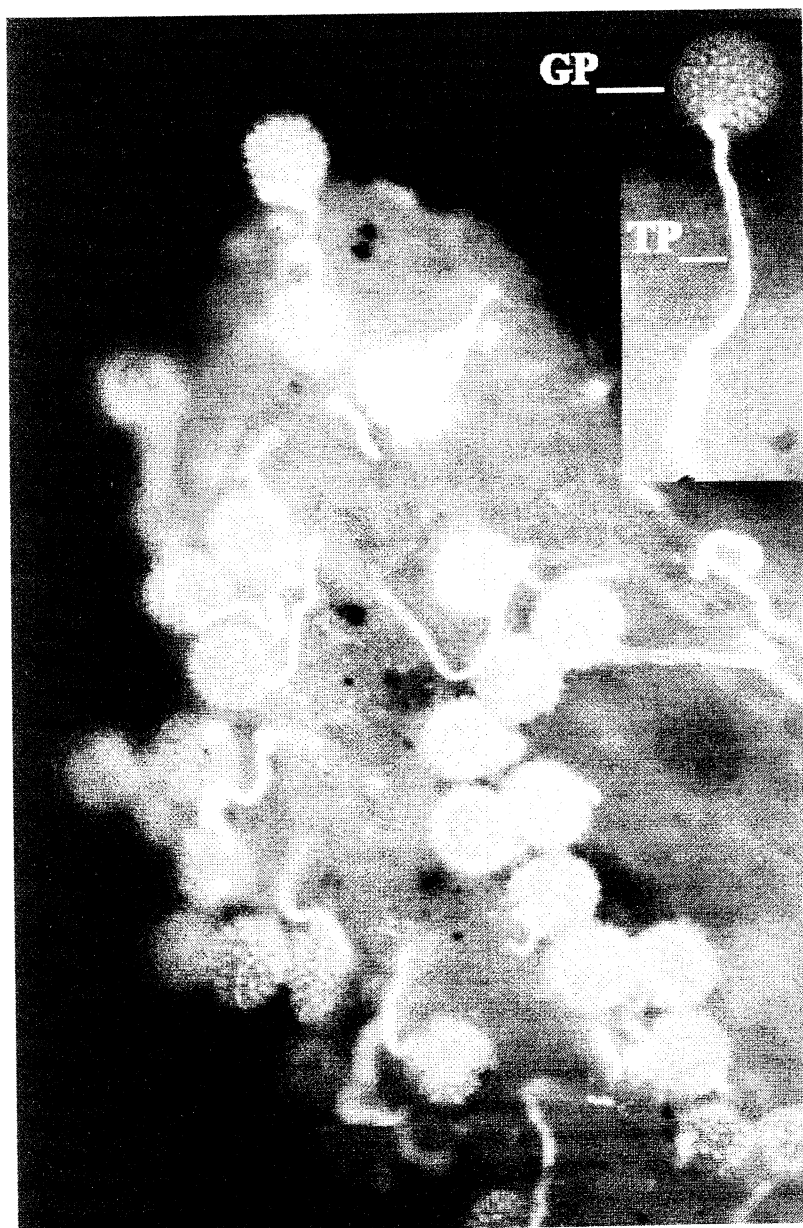


FIGURA 09: Microscopia de epifluorescência, em luz ultravioleta e filtro de 450 nm, de grãos de pólen de *Gossypium hirsutum* germinados *in vivo*.

GP- Grãos de pólen; TP- Tubo Polínico.

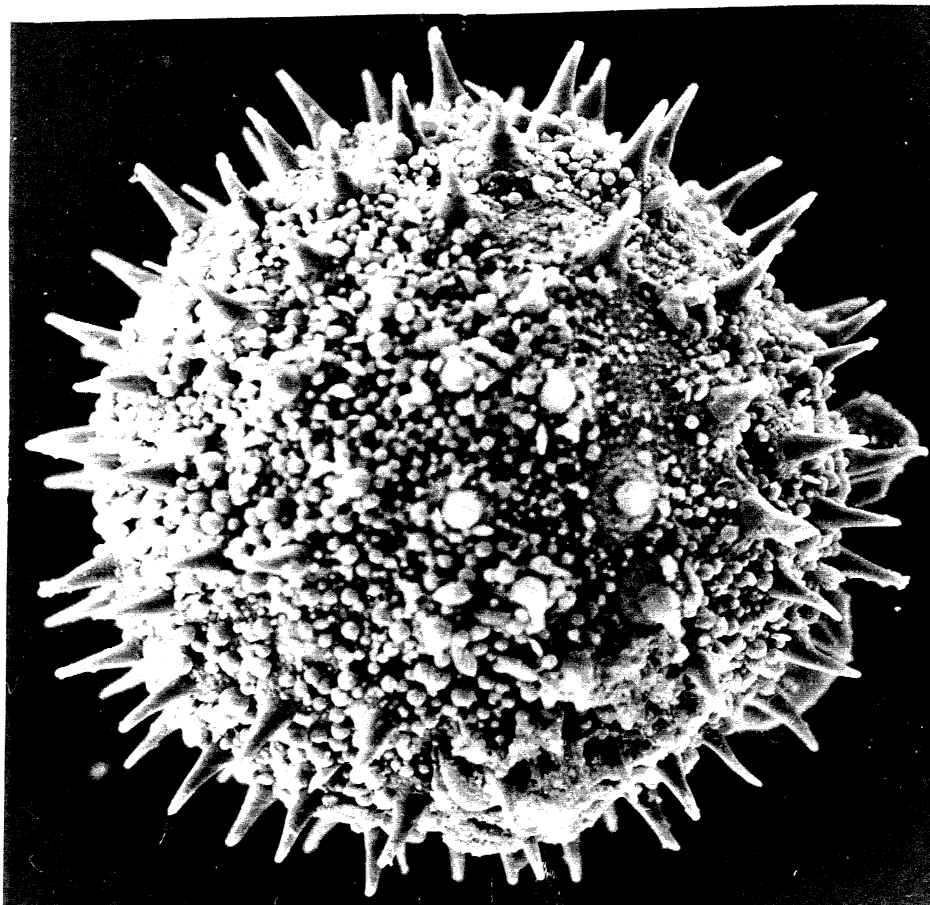


FIGURA 10: A microscopia eletrônica de Varredura do grão de pólen de *Gossypium hirsutum*.

Diâmetro médio de aproximadamente 80 μm . Espículas de comprimento variando entre 9-13 μm . **Ampliação 1956 X.**

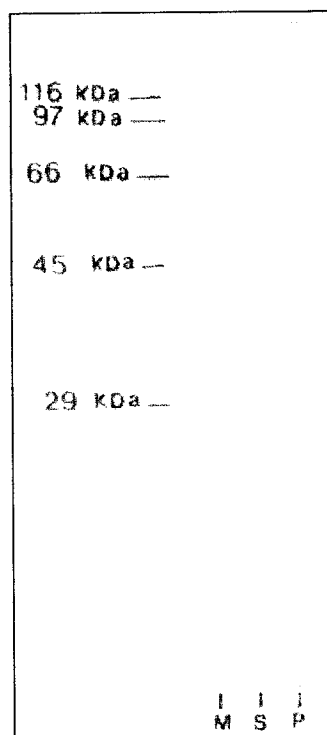


FIGURA 11: SDS-PAGE do sobrenadante e precipitado obtidas de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*.

A cada 100 μ l da fração sobrenadante e particulada foi acrescentado 50 μ l de solução STOP. Após aquecimento por dois minutos, em água em ebulição, acrescentou-se 10 μ l de β -mercaptoetanol. 10 μ l das frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida (12%) e os polipeptídeos foram separados eletroforéticamente usando corrente de 20 mA.

M- Padrão de peso molecular (SDS-6H).

S- Fração sobrenadante.

P- Fração Particulada.

4.4. Efeito de alta força iônica na atividade Mg^{++} -ATPásica do sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum* .

O sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*, quando em presença de alta força iônica apresenta um estímulo da atividade Mg^{++} -ATPase. Na dosagem em presença de NaCl 300 mM a atividade Mg^{++} -ATPase é cerca 60 % estimulada. Já com o acréscimo KCl 300 mM, tal atividade é estimulada em aproximadamente 50 % (figura 12).

4.5. Efeito de íons cálcio e calmodulina na atividade Mg^{++} -ATPásica do sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum* .

Na presença de cálcio e calmodulina a atividade Mg^{++} -ATPásica do sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*, sofre supressão. Tanto na presença de cálcio e cálcio/calmodulina ocorre uma redução da atividade Mg^{++} -ATPásica (atividade basal) em níveis aproximados de 50%. A atividade suprimida por cálcio (Mg^{++}/Ca^{++} ATPásica), ainda sofre modesta estimulação na presença de calmodulina. A utilização de trifluorperazina (antagonista de calmodulina), na presença de cálcio e ausência de calmodulina, restaura parte da atividade basal (em torno de 10-15% quando comparada com a atividade Mg^{++}/Ca^{++} -ATPásica).

Nesta fração, a atividade Ca^{++} -ATPase é bem inferior à atividade Mg^{++} -ATPase (figura 13).

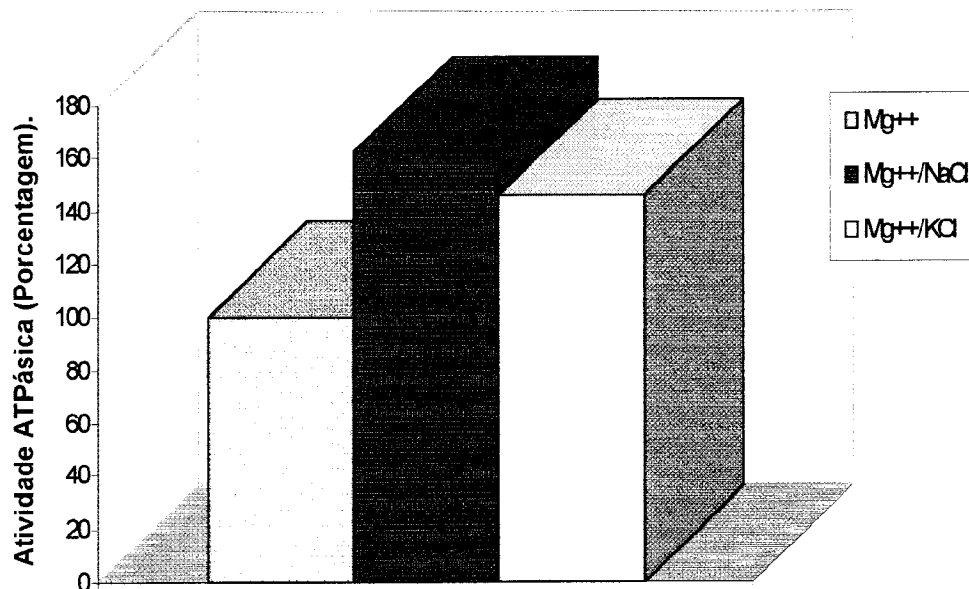


FIGURA 12: Efeito de alta força iônica na atividade Mg^{++} -ATPásica da fração S de *Gossypium hirsutum*.

20 μ l de S foi incubada à 37 °C por 30 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM) contendo $MgCl_2$ 5mM e concentração de sal conforme indicado. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg^{++} -ATPásica (49,0 nmoles Pi/ ml /min) foi considerada 100%.

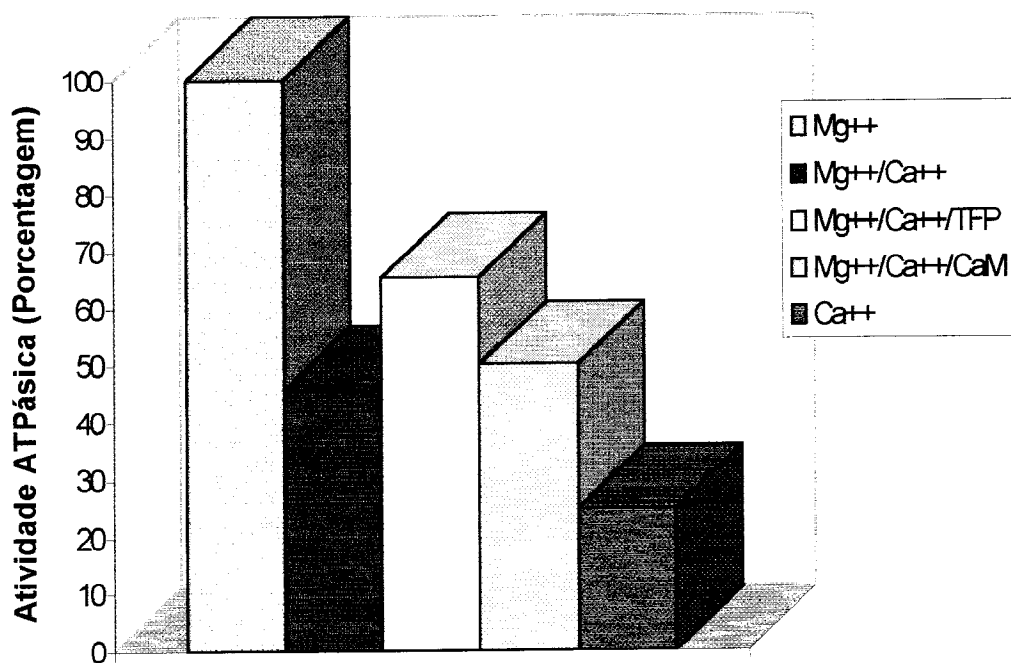


FIGURA 13: Efeito de cálcio e calmodulina, na atividade Mg^{++} -ATPásica da fração sobrenadante de *Gossypium hirsutum*.

20 μ l de S foi incubada à 37 °C por 30 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM) com ou sem $MgCl_2$ 5mM, e onde indicado $CaCl_2$ 3,2 mM, Calmodulina (CaM) 9,17 μ g/ml e Trifluorperazina (TFP) 500 μ M. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg^{++} -ATPásica (49,0 nmoles Pi/ml/min) foi considerada 100%.

4.6. Efeito de ortovanadato de sódio na atividade Mg^{++} -ATPásica do sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*.

O ortovanadato de sódio é um oxiânion, que apresenta semelhança em forma, tamanho e carga com íon fosfato. Por estas características é responsável pelo bloqueio da atividade enzimática de algumas ATPases (liga-se firmemente ao sítio catalítico da enzima). O sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum* foi testado frente a diferentes concentrações deste fator. A utilização de 50 μ M deste efector reduz a atividade Mg^{++} -ATPásica em aproximadamente 25 %. Na presença de 200 μ M de vanadato esta fração sofre supressão de cerca de 45 %, enquanto com concentração de 1 mM de vanadato é suficiente para inibir a Mg^{++} -ATPase para níveis de 16 % (Figura 14).

4.7. Efeito de íons alumínio e fluoreto de alumínio na atividade Mg^{++} -ATPásica do sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*.

O alumínio é considerado um elemento altamente tóxico em sistemas vegetais por diminuir a proliferação celular, reduzir o crescimento tecidual, ligar-se fortemente a histonas, inativar biologicamente a calmodulina [Os sítios ligantes de Ca^{++} têm 10 vezes mais afinidade a íons alumínio que ao próprio cálcio], alterar a permeabilidade da membrana plasmática a íons divalentes, inibir a despolimerização de microtúbulos ativada por cálcio, ligar-se fortemente ao ATP ao invés de Mg^{++} , etc.

A atividade Mg^{++} -ATPásica presente no sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum* apresenta redução em torno de 20 %, quando testada frente a íon alumínio e, tal atividade, é suprimida a

valores inferiores a 10 % na presença de fluoreto de alumínio. Na dosagem da atividade, onde o magnésio é substituído por alumínio, observa-se uma atividade ATPásica correspondendo a 35 % da atividade basal (figura 15).

4.8. Atividade (K/EDTA-ATPásica) de sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*.

A atividade ATPásica na ausência de cátions divalentes e na presença de alto potássio (K/EDTA - ATPase) é típica de algumas miosinas.

O sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*, não apresenta diferença significativa entre atividades, na ausência de Mg^{++} e com baixo e alto sal (KCl 60 mM e 600 mM), no entanto as atividades em baixo e alto sal não são similares em valores (tabela 01).

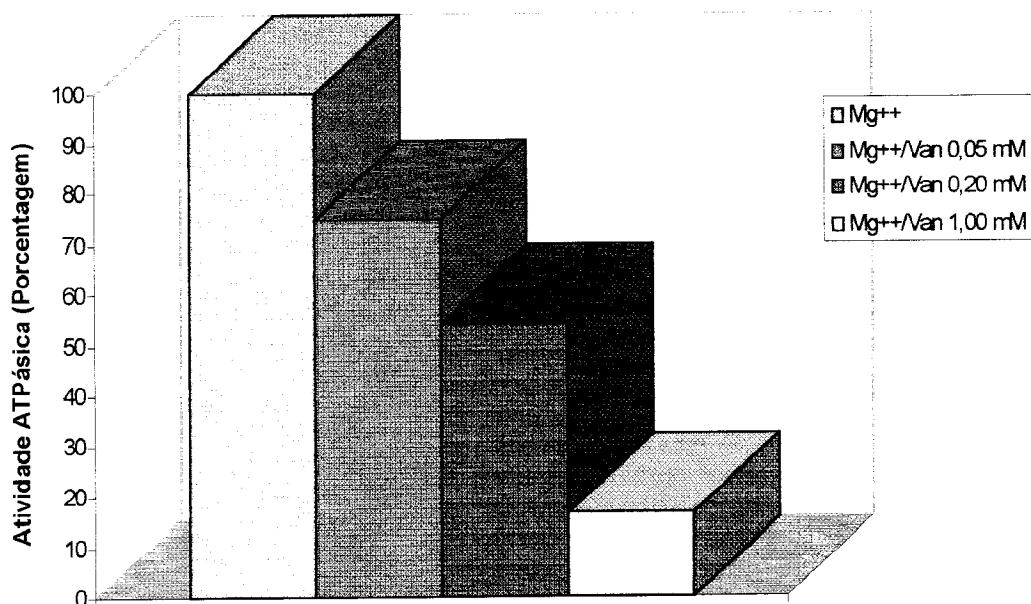


FIGURA 14: Efeito de ortovanadato de sódio (Van) na atividade Mg^{++} -ATPásica de fração S de *Gossypium hirsutum*.

20 μ l de S foi incubada à 37 °C por 30 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM) contendo $MgCl_2$ 5mM e ortovanadato de sódio ($NaVO_3$) conforme indicado. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg^{++} -ATPásica (49,0 nmoles Pi/ ml /min) foi considerada 100%.

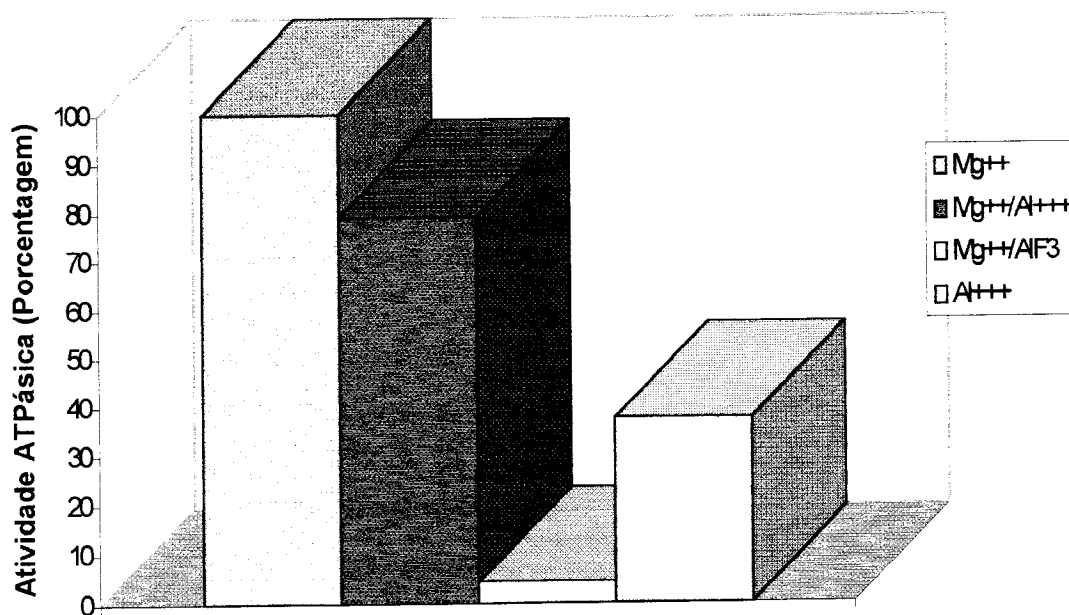


FIGURA 15: Efeito de íons alumínio e fluoreto de alumínio na atividade Mg⁺⁺-ATPásica de fração S de *Gossypium hirsutum*.

20 μ l de S foi incubada à 37 °C por 30 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM) e onde indicado MgCl₂ 5mM, cloreto de alumínio 2,5 mM e/ou Fluoreto de sódio 2,5 mM. Para o efeito de Fluoreto de alumínio utilizou-se cloreto de alumínio 2,5 mM mais Fluoreto de sódio 2,5 mM. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg⁺⁺-ATPásica (49,0 nmoles Pi/ ml /min) foi considerada 100%.

Fator	% Estimulação
Mg	100,0
K-EDTA (60 mM) **	95,8
K-EDTA (600 mM) **	120,8

TABELA 01: Atividade Mg^{++} -ATPase da fração S de *Gossypium hirsutum*.

A fração S de *Gossypium hirsutum* foi incubada à 37°C por 15 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1,0 mM e DTT 1,0 mM) contendo $MgCl_2$ 5 mM. A atividade K/EDTA-ATPásica (**) foi determinada em meio de reação II (Imidazol-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 0,5 mM, DTT 0,2 mM) em baixo e alto KCl conforme indicado. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg^{++} -ATPásica (49,0 nmoles Pi/ ml /min) foi considerada 100%.

Além dos trabalhos desenvolvidos com extrato de pólen e tubo polínico, utilizamos a gavinha como outro "modelo" para nossos estudos. O estudo deste tecido advém do nosso interesse em explorar ATPases motoras em outros tecidos vegetais e da existência de um período de escassez de flores de *Gossypium hirsutum* durante alguns meses do ano.

4.9. Fracionamento de sobrenadante de gavinha em coluna DEAE - Sepharose.

O sobrenadante foi obtido conforme descrito em Material e Métodos. A fração sobrenadante (S3) apresenta uma aparência límpida e coloração verde-amarelada.

A atividade Mg^{++} -ATPásica máxima eluída é encontrada antes do segundo pico proteico (0-300 mM de NaCl), que é acompanhada por absorvância a 280 nm. As frações 18-30 pertencentes ao pico de atividade constituem a fração denominada "Pool DEAE" (figura 16).

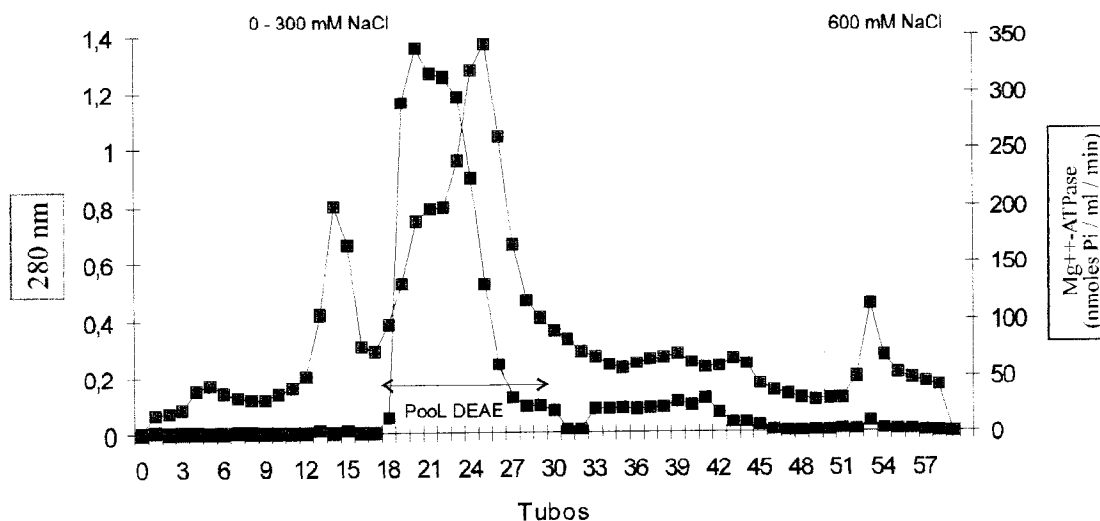


FIGURA 16: Fracionamento de S3 em coluna de DEAE-Sepharose.

A coluna foi previamente equilibrada em tampão de equilíbrio (Imidazol-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM) pH 8,0; sendo posteriormente lavada em mesmo tampão. Proteínas retidas foram eluídas em gradiente contínuo de NaCl 0-300 mM e, posteriormente, NaCl 600 mM; pH 7,2. A linha azul indica o início da eluição com 600 mM de NaCl. Para a atividade ATPásica, 20 μ l de cada fração da DEAE-Sepharose foi incubada à 37 °C por 15 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1,0 mM e DTT) pH 7,2, contendo MgCl₂ 5 mM. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem.

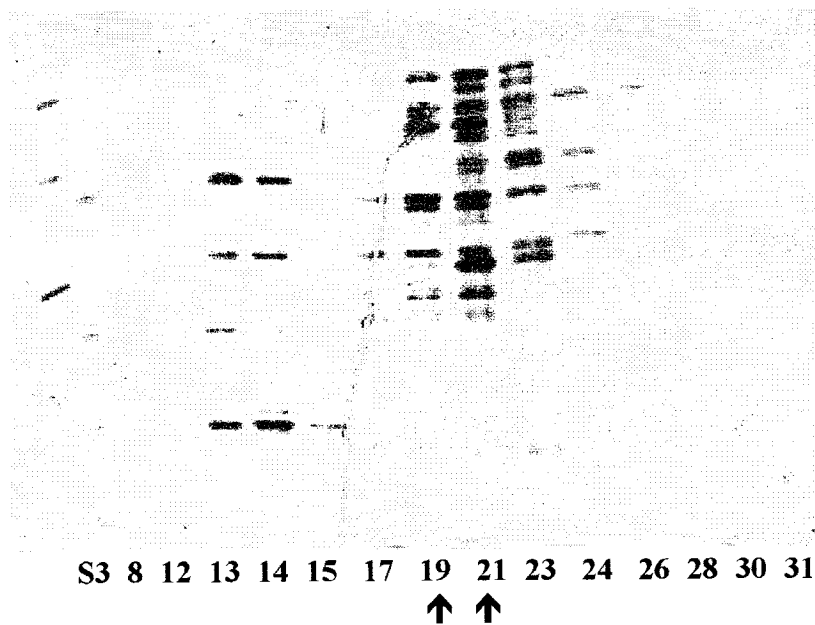


FIGURA 17: SDS-PAGE das frações eluidas da DEAE-Sepharose.

A cada 100 μl de cada fração adicionou-se 50 μl de solução STOP. 10 μl das frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e os polipeptídeos foram separados eletroforéticamente usando corrente de 20 mA. Após eletroforese o gel foi corado com Coomassie.

↑ Frações de maior atividade.

4.10. Efeito de alta força iônica na atividade Mg^{++} -ATPásica do "Pool" DEAE.

Diferente de ATPases obtidas de extrato de grão de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*, a fração "Pool" DEAE sofre inibição de cerca de 70% quando tratado com NaCl ou KCl 300 mM.

A utilização de KI permite uma inibição da atividade Mg^{++} -ATPásica pouco menos efetiva quando comparada ao NaCl e KCl (Figura 18).

4.11. Efeito de íons Cálcio na atividade Mg^{++} -ATPásica do "Pool" DEAE.

A atividade do "Pool" DEAE distinta da atividade isolada anteriormente, sofre uma acentuada estimulação quanto em presença de íons cálcio. Tal atividade, praticamente, corresponde ao dobro da atividade basal (Mg^{++} -ATPásica). O acréscimo de Trifluorperazina (antagonista de calmodulina) reduz a atividade estimulada por cálcio em torno de 40%. A fração "Pool" DEAE, apresenta uma atividade Ca^{++} -ATPásica (cerca de 50%) inferior à considerada basal (Mg^{++} -ATPase) (Figura 19).

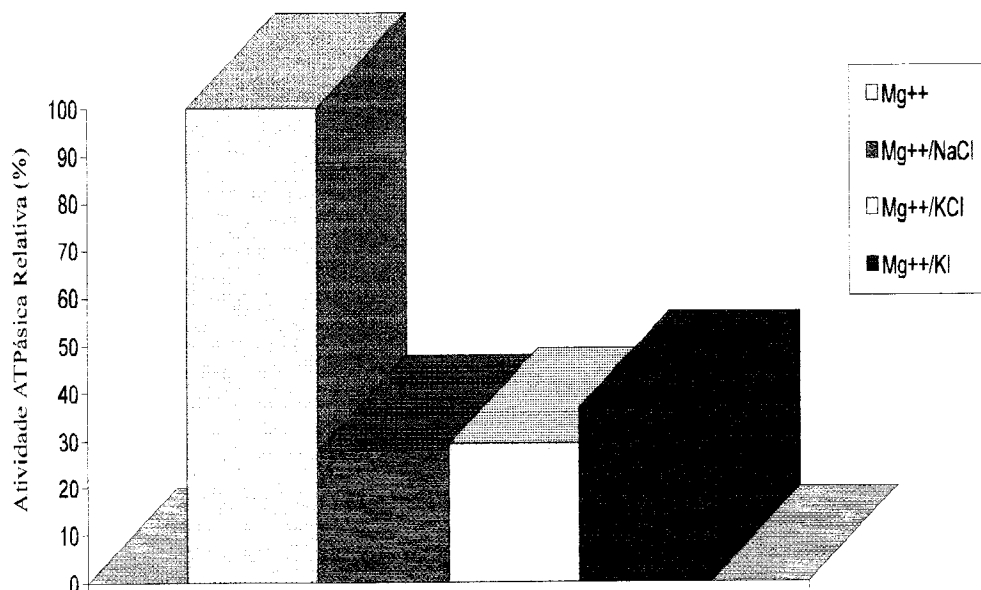


FIGURA 18: Efeito de alta força iônica na atividade Mg⁺⁺-ATPase do “pool” DEAE-Sepharose (Frações 18-30).

20 µl do “pool” DEAE-Sepharose foi incubada à 37 °C por 15 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1,0 mM e DTT) contendo MgCl₂ 5 mM com ou sem 0,3 M do sal indicado. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg⁺⁺-ATPase (148,4 nmoles Pi / ml / min) foi considerada 100 %.

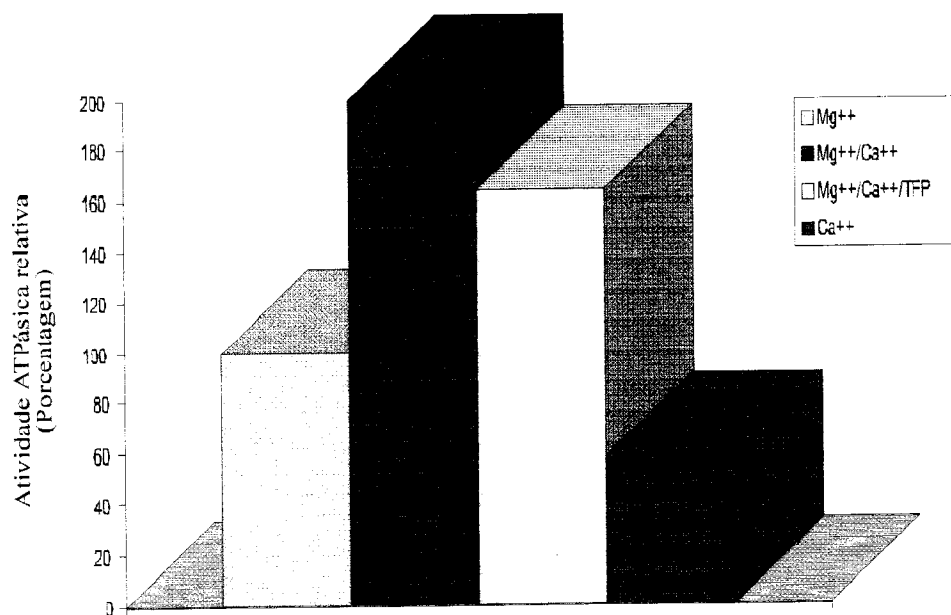


FIGURA 19: Efeito de íons Cálcio na atividade Mg⁺⁺-ATPásica do “pool” DEAE-Sepharose.

20 µl do “pool” DEAE-Sepharose foi incubada à 37°C por 15 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1,0 mM e DTT) com ou sem MgCl₂ 5 mM e onde indicado cloreto de cálcio 3,2 mM, trifluorperazina 500 µM. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg⁺⁺-ATPase (148,4 nmoles Pi / ml / min) foi considerada 100 %.

4.12. Efeito de íons alumínio na atividade Mg^{++} -ATPásica do "Pool" DEAE.

Diferente da atividade obtida a partir de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*, a Mg^{++} -ATPase do "Pool" DEAE é estimulada pela presença de íons alumínio no meio de reação. Esta estimulação nesta fração atinge o dobro da atividade Mg^{++} -ATPase. A presença de Trifluorperazina em meio de reação contendo magnésio e alumínio inibe a atividade estimulada por alumínio em torno de 25%.

E de maneira distinta da atividade de pólen descrita anteriormente, esta não apresenta valores significantes, quando os íons magnésio são substituídos por alumínio em meio de reação (Figura 20).

4.13. Caracterização da atividade ATPásica do "Pool" DEAE-Sepharose.

Vários efetores como, cálcio, calmodulina, vanadato, azida, fluoretos, alta concentração de sal e outros, têm sido utilizados para a caracterização de ATPases. Atividade do "Pool DEAE" foi testada frente a alguns destes efetores (tabela 02). A atividade ATPásica presente neste "Pool" apresenta uma inibição por vanadato de aproximadamente 15%, sendo que em ambas as concentrações de vanadato (0,05mM e 0,2 mM) esta característica se mantém.

Azida um inibidor clássico de F1-ATPase mitocondrial, praticamente não afeta a atividade presente nesta fração.

Os ensaios com fluoreto, demonstram uma inibição de cerca de 30%, quando o "Pool" é testado frente a fluoreto de sódio. Já, a combinação com cloreto de alumínio e fluoreto de sódio (para formação de fluoreto de alumínio) suprime esta atividade em aproximadamente 50%.

A atividade Ca^{++} -ATPásica desta fração é inferior a Mg^{++} -ATPásica e praticamente inexistente a atividade K-EDTA (Tabela 02).

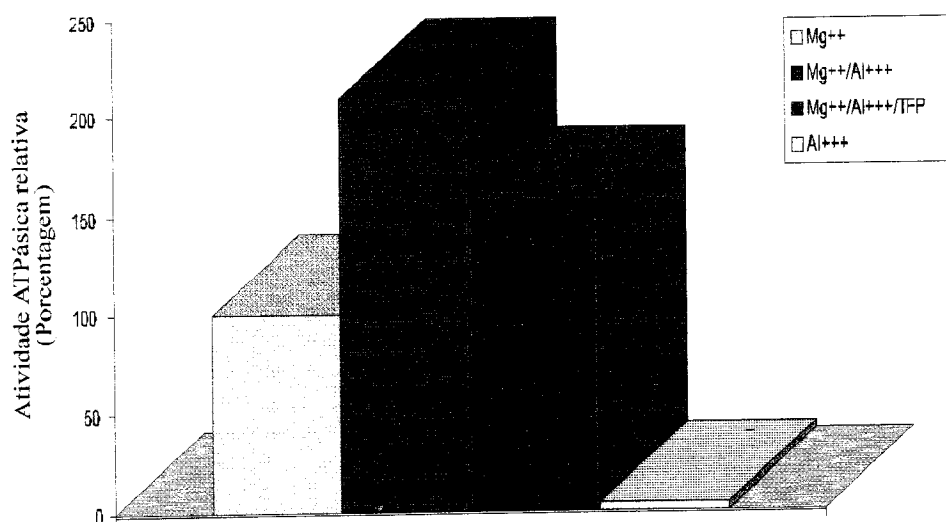


FIGURA 20: Efeito de íons alumínio na atividade Mg^{++} -ATPásica do “pool” DEAE-sepharose.

20 μ l do “pool” DEAE-Sepharose foi incubada à 37 °C por 15 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1,0 mM e DTT) com ou sem $MgCl_2$ 5 mM e conforme indicado cloreto de alumínio 2,5 mM e trifluorperazina 500 μ M . A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg^{++} -ATPase (148,4 nmoles Pi / ml / min) foi considerada 100 %.

Fator	% Estimulação
Mg	100,0
Vanadato (50 μ M)	88,4
Vanadato (200 μ M)	85,3
Azida (1,0 mM)	92,4
Fluoreto de sódio (2,5 mM)	70,0
Fluoreto de alumínio (2,5 mM)	46,8
Cloreto de cálcio **	58,7
K-EDTA (60 mM) **	0,1
K-EDTA (600 mM) **	0,1

TABELA 02: Caracterização da atividade ATPásica do “pool” DEAE-Sepharose

20 μ l do “pool” DEAE-Sepharose foi incubada à 37^oC por 15 minutos em meio de reação I (Imidazol-HCl 25 mM, KCl 60 mM, EDTA 1,0 mM e DTT) contendo MgCl₂ 5 mM com ou sem efetor. (**) Na Ca⁺⁺-ATPásica o Mg⁺⁺ foi substituído por cloreto de cálcio 3,2 mM e a (**) atividade K/EDTA-ATPase foi desenvolvida em meio de reação II (Imidazol 25 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 0,2 mM, pH 8,0) em baixo e alto K⁺ conforme indicado. A reação foi iniciada com ATP 1mM (concentração final) e interrompida com a própria solução de dosagem. A atividade Mg⁺⁺-ATPase (148,4 nmoles Pi / ml / min) foi considerada 100 %.

5. DISCUSSÃO

Sob nossas condições, ou seja, sob condições que não apresentam um sistema apurado para o controle de fatores ambientais (como por exemplo: temperatura, umidade) obtivemos com grãos de pólen de *Gossypium hirsutum* reposta de germinação superior a 60 % (Figura 07).

Para estudos e visualização da germinação de grãos de pólen *in vivo*, foram dissecados pistilos de *Gossypium hirsutum* e observados em microscopia de epifluorescência (figura 09). Tais resultados nos deram ideia de como é constituída a estrutura e morfologia de grãos de pólen e tubo polínico.

Partindo, então, de percentuais de germinação superiores a 60% foram iniciados os ensaios bioquímicos visando a identificação, a nível de sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico, de ATPases que apresentassem características bioquímicas típicas de algumas proteínas motoras conhecidas.

Semelhante à ATPase citosólica isolada de cérebro de rato (Coelho, et al, 1988) e distinta da isolada a partir de testículo de coelho (Patussi, 1996) a atividade detectada em sobrenadante de extrato de grão de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum* é estimulada em presença de alta força iônica (KCl e NaCl 300 mM), sendo que esta atividade é cerca de 50-60% superior à atividade Mg^{++} -ATPase considerada basal (Figura 12). Parte do estímulo por KCl pode ter como causa a estimulação de H^+ -ATPases presente no sobrenadante (Serrano, 1983).

Ainda quanto ao efeito da alta força iônica, foi observado que a utilização de KI 300 mM é inviável neste ensaio. O KI complexa-se com compostos ricos em carboidratos, especialmente microgrânulos de amido e hemiceluloses, oriundos tanto do citoplasma como da intina; e produz uma coloração azul pálida que se intensifica com o tempo. Esta coloração reflete um comprimento de onda que interfere na leitura da absorbância a 355 nm (ensaio de atividade ATPásica).

Quanto a resposta a cálcio e calmodulina, o sobrenadante de pólen e tubo polínico comporta-se de maneira distinta a alguns motores moleculares, respondendo com uma redução dos níveis de atividade quando exposto a cálcio e calmodulina. Uma das possibilidades deste comportamento é a competição entre íons Mg^{++} e Ca^{++} , nos sítios ligantes de ATP (na forma de Mg^{++} -ATP). Estes parâmetros não foram avaliados em termos de cinética enzimática em função de se tratar de uma fração não pura, ou seja, constituída de várias ATPases (Figura 13).

Já, no que se refere ao efeito de TFP na atividade Mg^{++} -ATPase suprimida por cálcio, ainda é alvo de investigação mais apurada, uma vez que, a concentração de TFP utilizada nestes ensaios (500 μM) superam em muito a dosagem convencional (50 μM) para bloqueio da atividade biológica de calmodulina (Figura 13). Ainda cabe ressaltar que tal fator (TFP) não é específico para a inibição de tal proteína (calmodulina).

A utilização de ortovanadato de sódio em sistemas que envolvem miosinas têm demonstrado um bloqueio em 50% da atividade ATPásica em concentrações em torno de 400 μM de vanadato (Goodno, C. C., 1982) e que em concentrações próximas a 5 μM ocorre inibição completa da motilidade ciliar e flagelar, representando um potente inibidor de proteínas motoras da família das dineínas (Gibbons, I. R. et al, 1978 e 1987). É conhecido, também que cinesinas são inibidas cerca de 50-60% quando tratadas em presença de 60 μM deste fator (Valle e Sheptner, 1990). No sobrenadante de pólen e tubo polínico observa-se uma inibição crescente com a concentração de ortovanadato de sódio. Assim, a inibição documentada com 0,05 mM (50 μM) com este efetor, possivelmente represente uma inibição de famílias de dineínas, enquanto aquelas determinadas em valores superiores a 0,2 mM (200 μM) sejam pertencentes a proteínas com características bioquímicas de cinesina, ou

mesmo outras, como por exemplo miosinas. (figura 14). Outro fator que nos chama a atenção é a atividade residual, determinada após o tratamento com 1 mM de vanadato (figura 14). Tal atividade (cerca de 16%), será futuramente avaliada na presença de efetores de miosina (como por exemplo, actina) já que resiste a valores superiores a 400 μM (figura 14).

O sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico também foi avaliado quanto ao efeito de fluoreto de alumínio, que parece estar envolvido no bloqueio do transporte de vesículas (Melançon et al, 1987; Orci et al, 1989). O tratamento com fluoreto de alumínio, semelhante ao identificado em ATP/GTPase isolada de testículo de coelho (Patussi, 1996) reduz sensivelmente os valores da atividade ATPásica (figura 15).

Quando testado com alumínio (AlCl_3 2,5 mM), o sobrenadante sofre uma inibição na atividade Mg^{++} -ATPásica comportando-se de maneira semelhante a outras ATPases reportadas na literatura, como ATPases de membrana plasmáticas, H^+ -ATPases, etc (Shu-I, e Broquillet, 1886; Yon, e Nelson, 1991; Kochian, 1995). Nestes ensaios observa-se o elevado nível de atividade (35%) alcançado em meio de reação desprovido de Mg^{++} e com AlCl_3 2,5 mM (figura 15). Este fato pode ter como causa duas possibilidades: 1) reconhecimento "enganoso" nos sítios ligantes de ATP, que ora possam estar ocupados com Al^{+++} -ATP ao invés de Mg^{++} -ATP (Kochian, 1995); 2) a presença de uma Al^{+++} -ATPase neste sobrenadante. Na literatura não existe relato da presença de uma Al^{+++} -ATPase ou mesmo de uma Mg^{++} -ATPase estimulada por tal íon.

O sobrenadante foi avaliado quanto a presença de atividade K/EDTA-ATPase (atividade típica de miosinas da classe II) e neste ensaio foi observado uma leve estimulação da atividade por KCl 600 mM; tal estimulação pode ter como possível explicação o resultado enzimático de uma pequena concentração de miosina II. Tal estimulação (por K) não é contribuição de uma

H⁺-ATPase, já que esta necessita de um complexo Mg⁺⁺/ATP no sítio catalítico (Serrano, 1983), o que é inexistente no sistema constituído por EDTA. Esses resultados ainda serão objeto de investigações mais apuradas, onde será incluído a utilização de F-actina (Tabela 01).

Também foi de nosso interesse o estudo de ATPases presentes em gavinha *Passiflora sp.* Neste "modelo", identificamos uma fração solúvel que apresenta atividade ATPásica sensível a alta força iônica. Nesta fração ("Pool"- DEAE) a utilização de alto sal suprime cerca de 70% da atividade ATPásica basal (Mg⁺⁺-ATPase). Dentre os sais utilizados, o iodeto de potássio é o que apresenta menor grau de inibição (66%) e não ocorre a formação de coloração azul evidenciada em preparações de pólen (figura 18).

Quando analisada a atividade Mg⁺⁺-ATPásica em resposta a adição de cálcio, a fração responde bioquimicamente de maneira semelhante a miosina de classe V, com uma estimulação (figura 19). Já, quando analisada em meio contendo somente cálcio, a ATPase responde com atividade reduzida, indicando não se tratar de uma Ca⁺⁺-ATPase (Figura 19). A presença de trifluorperazina (500 µM) produz uma inibição tímida nos valores da atividade ATPásica desta fração (figura 19). Posteriormente, pretendemos explorar tal atividade na presença de calmodulina e actina.

Na fração, obtida a partir de gavinha de *Passiflora sp* ("Pool" DEAE) o íon alumínio (AlCl₃ 0,5 mM) comporta-se de forma semelhante ao observado com a adição de cálcio, estimulando a atividade ATPásica em valores superiores ao dobro da atividade inicial (figura 19 e 20). Tal estimulação, ainda é alvo de estudos mais elaborados e estamos estudando possível participação de calmodulina neste evento. Outra perspectiva é analisarmos se esta ATPase é resultante de um mecanismo bioquímico de tolerância a alumínio, uma vez que a nossa população estudada está estabelecida em solo mesotrófico, ácido e rico

em alumínio. Semelhante ao que se observa em ensaio com cálcio, a ação da trifluorperazina é modesta (figura 19).

Quanto a utilização de fluoreto de alumínio, semelhante ao observado em sobrenadante de grãos de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*, detecta-se uma inibição na atividade ATPásica (cerca de 55%). A utilização de fluoreto de sódio previne a atividade Mg^{++} -ATPase em aproximadamente 30% (Tabela 02).

Nesta fração, diferente do observado na atividade de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum*, a reação em meio sem Mg^{++} e com $AlCl_3$ 0,5 mM, praticamente não exibe atividade ATPásica (figura 20).

Um indicativo que a fração isolada de gavinha não é uma F1-ATPase mitocondrial é que, esta, quando submetida a ensaio em meio de reação contendo 1 mM de azida, não sofre inibição significativa (tabela 02). Outro ponto relevante é que ensaios com ortovanadato em até 200 μ M, ou seja, em concentrações insuficientes para suprimir sensivelmente a atividade ATPásica de miosinas, não ocorre a redução drástica nos níveis da atividade original da fração de *Passiflora sp* (tabela 02). No entanto, esta fração não apresenta atividade ATPásica estimulada por 600 mM de potássio na presença de EDTA, o que é característico de algumas miosinas (tabela 02).

6. REFERÊNCIAS

- 1- BITTNER, M., KUPFERER, P. E MORRIS, C. F. (1980). Eletrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gel to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. **Anal. Biochem.** 102: 459-471.
- 2- BLAKE, M. S.; JOHNSTON, K. H.; RUSSEL-JONES, G. J.; GOTSCHLICH, E. C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. **Anal. Biochem.** 136: 175-179.
- 3- BLOOM, G. S.; WAGNER, M. C.; PFISTER, K. K.; BLADY, S. T. (1988). Native structure and physical properties of bovine brain kinesin, and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. **Biochemistry.** 27: 3409-3416.
- 4- BOMSEL, M.; PARTON, R.; KUZNETSOV, S. A.; SCHROER, T. A.; GRUENBERG, J. (1990). **Cell.** 62: 719-731.
- 5- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- 6- BRADY, S. T.; PFISTER, K. K.; BLOOM, G. S. (1990). A monoclonal antibody to the heavy chain of kinesin inhibits anterograde and retrograde axonal transport in isolated squid axoplasm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87: 1061-1065.
- 7- CHENEY, R. E.; MOOSEKER, M. S. (1992) Unconventional myosins. **Curr. Op. Cell Biol.** 4: 27-35.

- 8- CHENEY, R. E.; RILEY, M. A.; MOOSEKER, M. S. (1993a). Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. **Cell Motility and the Cytoskeleton**. 24: 215-223.
- 9- CHENEY, R. E.; O SHEA, M. K.; HEUSER, J. E.; COELHO, M. V.; WOLENSKI, J. S.; ESPREAFICO, E. M.; FORSHER, P.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. (1993b). Brain myosin - V is a two-head unconventional myosin with motor activity. **Cell**. 75: 13-23.
- 10- COELHO, M. V. (1988) Regulação de ATPase e Proteína - Quinase por Ca / Calmodulina em Citosol de Cérebro de Rato. **Tese de mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP**.
- 11- COLLINS, J. H.; BORYSENKO, C. W. (1994). The 110.000 - dalton actin and calmodulin-binding protein from intestinal brush border is a myosin-like ATPase. **J. Biol. Chem**. 259: 14128-14135.
- 12- CONDEELIS, J. S. (1974). The identification of F-actin in the pollen tube and protoplast of *Amaryllis belladonna*. **Expl. Cell Res**. 88: 435-439.
- 13- COTÉ, G. P.; ALBANESI, P. J.; UENO, T.; HAMMER, J. A.; KORN, E. D. (1985). Purification from *Dictyostelium discoideum* of a low-molecular-weight myosin that resembles myosin I from *Acanthamoeba castellanii*. **J. Biol. Chem**. 260: 4543-4546.
- 14- ENDOW, S. A. e TITUS, M. A. (1992). Genetic approaches to molecular motors. **Ann. Rev. Cell Biol**. 8: 29-66.

- 15- GIBBSONS, I. R.; COSSON, M. P.; EVANS, J. A.; GIBBSONS, B. H.; KARL, H.M.; WINFIELD, S.S. e TANG, W.J. Potent inhibition of dynein adenosine triphosphatase and the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**: 75: 2220-2224.
- 16- GIBBSONS, I.R.; LEE-EIFORD, A.; MOCZ. G.; PHILLIPSON.C.A.; TANG W.J e GIBBSONS, B.H.. (1987). Photosensitized cleavage of dynein heavy chains.**Jornal of Biology Chemistry**. 262. Nº 02: 2780-2786.
- 17- GOODNON,C.C. (1982). Myosin active-site trapping with vanadate ion. **Methods in enzymology**. 85: 117-123.
- 18- GOODSON, H. V.; SPUDICH, J. A. (1993). Molecular evolution of the myosin family: Ralationships derived from comparisons of amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 659-663.
- 19- GOPALAKRISHNA, R.; ANDERSON, W. (1982). Ca-induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. **Biochem. Biophy. Res. Commun**. 104: 830-836.
- 20- HAINONEN, J. K. e LAHTTI, R. J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatases. **Anal. Biochem**. 113: 313-317.
- 21- HAMMER, J. A. (1991). Novel myosins. **Trends Cell Biol**. 1: 50-56.

- 22- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; CRESTI, M.; TIEZZI, A.; MOSCATELLI, A. (1988). Cytoskeletal Elements, cell shaping and movement in the angiosperm pollen tube. **J. Cell Science.** 91: 49-60.
- 23- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. (1989). Myosin associated with the surfaces of organelles, vegetative nuclei and generative cells in angiosperm pollen grains and tubes. **J. Cell Science.** 94: 319-325.
- 24- HIROKAWA, N.; PFISTER, K. K.; YORIFUJI, H.; WAGNER, M. C.; BRADY, S. T.; BLOOM, G. S. (1989). Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. **Cell** 56: 867-878.
- 25- JAFFE, M. J.; GALSTON, A. M.; (1966). Physiological studies on pea tendrils. II. The role of light and ATP in contact coiling. **Plant physiol.** 41: 1152-1158.
- 26- JAFFE, M. J.; GALSTON, A. W. (1967). Physiological studies on pea tendrils. III. ATPase activity and contractility associated with coiling. **Plant physiol.** 42: 845-847.
- 27- KASSAB, A.L. (1986) *Algodão. Coleção Brasil Agrícola. Ícone.* São Paulo- Brasil.
- 28- KNIGHT, A. E.; KENDRICK-JONES, J. (1993). A myosin-like protein from a higher plant. **J. Mol. Biol.** 231: 148-154.
- 29- KOCHIAN, L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 46: 237-260.

- 30- KORN, E. D.; HAMMER, J. A. (1988). Myosins of nonmuscle cells. **Annu. Rev. Biophys. Chem.** 17: 23-45.
- 31- KUZNETSOV, S. A.; VAISBERG, E. A.; SHANINA, N. A.; MAGRETOVA, N. N.; CHERNYAK, V. Y. (1988). The quaternary structure of bovine brain kinesin. **EMBO J.** 7: 353-356.
- 32- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- 33- LYE, R. J.; PORTER, M. E.; SCHOLEY, J. M.; McINTOSH, J. R. (1987). Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. **Cell** 51: 309-318.
- 34- MA, Y.; YEN, L. (1988). Actin and myosin in pen tendrils. **Plant. Physiol.** 89: 586-589.
- 35- MARTIN, F. (1959). Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain technology.** 34: 125-126.
- 36- MELANÇON, P.B. (1987). Involvement of GTP binding proteins in transport through the golgi stack. **Cell.** 51: 1053-1062.
- 37- ORCI, L.M. (1989). Brefeldin A, a drug that block secretion, prevents the assembly of non clathrin coated buds on golgi cisternae. **Cell.** 56: 357-368.
- 38- PASCHAL, B. M.; SHPETNER, H. S.; VALLEE, R. B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules *in vitro* and has dynein-like properties. **J. Cell. Biol.** 105: 1273-1282.

- 39- PATUSSI, E.V. (1996). Caracterização parcial de uma fração enriquecida em atividade ATP/ GTPase obtida a partir de testículo de coelho. **Tese de mestrado-Universidade Federal de Uberlândia - MG.**
- 40- POLLARD, T. D.; KORN, E. D. (1973). Acanthamoeba myosin. **J. Biol. Chem.**, 248: 4682-4690.
- 41- POLARD, T. D.; DOBERSTEIN, S. K.; ZOT, H. G. (1991). Myosin-I. **Annu. Rev. Physiol.** 53: 653-681.
- 42- SERRANO, R. (1983). Purification and reconstitution of H⁺-Pumping ATPase of fungal and plant plasma membrane. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 227.
- 43- SHOER, T. A.; STEUER, E. R.; SHEETZ, M. P. (1989). Cytoplasmic dynein is a minus enddirected motor for membranous organelles. **Cell** 56: 937-946.
- 44- SHU-I,T. e BROQUILLETE, J.N.(1987). Metal inhibition of corn root plasma membrane ATPase. **Phytochemistry.** 26: 65-69.
- 45- STUDIER, F. W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.** 79: 237-248.
- 46- TANG, X.; LANCELLE, S. A.; E HEPLER, P. K. (1989a). Fluorescence microscopic localization of actin in pollen tube: Comparison of actin antibody and phalloidin stainine. **Cell Motil. Ctoskeleton.** 21: 132-137.
- 47- TANG, X.; HEPLER, P. K.; SCORDILIS, S. P. (1989)b. Immunochemical and immunocytochemical identification of a myosin heavy chain polypeptide in *Nicotiana* pollen tubes. **J. Cell Science** 92: 569-574.

- 48- TIEZZI, A.; MOSCATELLI, A.; CAI, G.; BARTALESE, A.; CRESTI, M. (1992). An immunoreactive homolog of mammalian kinesin in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. **Cell Motil. Cytoskeleton**. 21: 132-137.
- 49- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76: 4350-4354.
- 50- VALE, R. D.; GOLDSTEIN, L. S. (1990). **Cell** 60: 883-885.
- 51- VALE, R. D.; REESE, T. S.; SHEETZ, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. **Cell** 42: 39-50.
- 52- VALLEE, R. B.; WALL, J. S.; PAXCHAL, B. M.; SHPETNER, H. S. (1988). Microtubule associated protein 1C from Brain is a two-headed cytosolic dynein. **Nature** 332: 561-563.
- 53- WALDER, R. B.; SHEETZ, M. P. (1993). Cytoplasmic microtubule-associated motors. **Ann. Rev. Biochem.** 62: 429-451.
- 54- WARRICK, H. M.; SPUDICH, A. (1987). Myosin structure and function in cell motility. **Annu. Rev. Cell Biol.** 3: 379-421.
- 55- WEISENBERG, R.; TAYLOR, E. W. (1968). Studies on ATPases activity of sea urchin eggs and the isolated mitotic apparatus. **Exp. Cell Res.** 53: 372-384.
- 56- YANG, J. T.; LAYMOM, R. A.; GOLDSTEIN, L. S. B. (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. **Cell** 56: 879-889.

- 57- YEN, L.; WANG, X.; TENG, X.; MA, Y.; LIU, G. (1986). Actin and myosin in pollens and their role in the growth of pollen tubes. **Kexue Tongbao**. 31: 267-272.
- 58- YONG, G. e NELSON, D.J. (1991). Aluminum ion vs. calcium ion binding to methionine or tyrosine spin-labeled bovine brain calmodulin. **Jornal of inorganic biochemystry**. 41 (4): 283- 292.
- 59- YONG-ZE, M. e YEN, L.(1989). Actin and myosin in pea tendrils. **Plant Physiol**. 89: 586-589.

RESUMO

Motores moleculares são enzimas mecanotransdutoras que hidrolizam a molécula de ATP, convertendo parte desta energia mecânica em força motriz. Tais proteínas estão divididas em três famílias: miosinas, cinesina e dineína. As miosinas realizam movimentos ao longo de filamentos de actina, enquanto os outros dois grupos utilizam microtúbulos como suporte.

Particularmente em tecidos vegetais, dois sistemas altamente dinâmicos são reconhecidos: a- o crescimento do tubo polínico e b- movimento de curvatura em gavinhas. O tubo polínico tem origem em um dos constituintes do grão de pólen (a célula do tubo) e é de fundamental importância na reprodução de vegetais superiores por representar o elemento de condução dos núcleos espermáticos até o saco embrionário (oosfera). Pressupõem-se que esses eventos de migração citoplasmática e transporte de organelas só são possíveis graças a presença de um citoesqueleto organizado e ATPases motoras associadas. No que se refere a gavinha, seu movimento coordenado ao redor de um substrato é altamente dependente da hidrólise de ATP, e tal atividade biológica sugere a presença de proteínas motoras associadas. Neste trabalho caracterizamos a atividade ATPásica presente na fração solúvel obtida de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum* e de gavinha de *Passiflora sp.* 1) Os grãos de pólen foram germinados em Sacarose 10 %, Cloreto de cálcio 2,5 mM, Cloreto de magnésio 2,5 mM, pH 6,8 e homogeneizados em tampão de coleta (Imidazol-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, Benzamidina 1 mM e PMSF 0,3 mM). Ao homogeneizado foi acrescentado ATP 5 mM, seguido de centrifugação 8.000 x g por 20 minutos á 4 °C. Posteriormente, a fração sobrenadante foi dialisada em tampão: Imidazol-HCl 20 mM, pH 8,0, DTT 0,1 mM e EDTA 0,1 mM. 2). Já a gavinha foi coletada em solução salina a 2 °C seguida de homogeneização em tampão de extração T.E (Imidazol-HCl 50 mM, pH 7,2, EDTA 10 mM e β -mercaptoetanol 1 mM e PMSF 0,3 mM. Homogeneizado foi submetido a

tratamento de Sulfato de Amônio 30-50% de saturação e centrifugado a 34.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi aplicado em coluna de DEAE-Sepharose e as proteínas retidas foram eluídas em tampão (Imidazol-HCl 10 mM, pH 7,2, EDTA 0,1 mM e DTT 0,1 mM) em gradiente de 0 a 300 mM de NaCl seguido de 600 mM deste sal. A atividade Mg-ATPase isolada do sobrenadante de extrato de pólen e tubo polínico de *Gossypium hirsutum* é estimulada cerca de 60 % por alta força iônica (KCl e NaCl 300 mM) e é suprimida por cálcio. Essa atividade apresenta sensibilidade crescente ao ortovanadato de sódio. A Atividade típica de miosina (K/EDTA-ATPase) não foi detectada neste sobrenadante. A atividade isolada de gavinha de *Passiflora sp*, diferente da atividade citada anteriormente, é inibida em presença de alta força iônica e responde com uma estimulação quando o cálcio é incorporado no meio de reação. A atividade Mg-ATPásica desta fração também é estimulada em presença de alumínio. A utilização de ortovanadato de sódio produz tímida inibição da atividade ATPásica. Nesta ainda, observa-se uma sensibilidade de 55% na presença de fluoreto de alumínio. A atividade típica de miosina também não é detectada nesta fração.

