

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

CAIO MOTTA CAMPOS

**ALTERAÇÕES MOLECULARES POR SINAIS SONOROS NAS CASCATAS
REGULATÓRIAS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

CAIO MOTTA CAMPOS

**ALTERAÇÕES MOLECULARES POR SINAIS SONOROS NAS CASCATAS
REGULATÓRIAS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Flávia Maria da Silva Carmo

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C198a
2020 Campos, Caio Motta, 1994-
Alterações moleculares por sinais sonoros nas cascatas
regulatórias da germinação de sementes / Caio Motta Campos. –
Viçosa, MG, 2020.
24 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Flávia Maria da Silva Carmo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.20-24.

1. Germinação. 2. Sons. 3. Giberelinas. 4. Cálcio -
Antagonistas. 5. Genes reguladores. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Ecologia. II. Título.

CDD 22. ed. 571.862

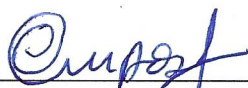
CAIO MOTTA CAMPOS

ALTERAÇÕES MOLECULARES POR SINAIS SONOROS NAS CASCATAS
REGULATÓRIAS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Ecologia,
para a obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

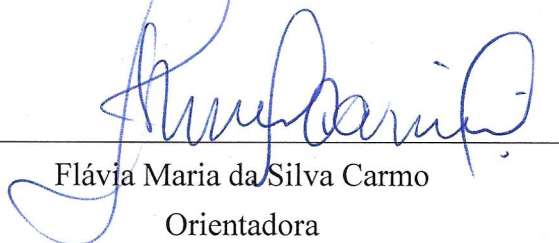
APROVADA: 15 de junho de 2020

Assentimento:



Caio Motta Campos

Autor



Flávia Maria da Silva Carmo

Orientadora

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Passar por esse mestrado foi uma experiência única, difícil, mas muito gratificante e eu não teria feito nada disso sem várias pessoas que estavam ao meu lado. Por isso me sinto no dever de agradecer a todas elas.

Primeiro, gostaria de agradecer a mim. Sim, a mim mesmo. Pode soar clichê, mas sem minha força de vontade para continuar mesmo nas adversidades que passei nesse mestrado, eu não teria conseguido.

Em segundo, e multiscíssimo importante esse agradecimento, à minha orientadora Flávia Maria. Por ter me acolhido, mesmo com o tempo reduzido pela metade e mesmo com todos os problemas que tivemos. Ela sempre esteve ali do meu lado e me incentivou a continuar. Foi mais que uma orientadora, foi uma amiga de verdade. Essa dissertação é mais que um agradecimento é um presente a ela. Nós conseguimos.

Agradeço também aos meus amigos que sempre, desde sempre e para sempre, estão no meu coração e que mesmo eu sento um pouco distante eu os amo de uma forma tão incondicional que nem sei. Mesmo que não saibam, TODOS eles têm alguma parte nesse trabalho. Sem eles, sem as conversas, as saídas para festas, sem todas as interações que fazem de nós seres sociais eu teria ficado, mais, louco.

Não poderia deixar de fora um agradecimento especial à minha psicóloga e à minha psiquiatra por me ajudar a manter a sanidade mesmo nos momentos mais difíceis e estressantes. São graças a elas que eu estou conseguindo recuperar partes de mim que eu havia perdido e conhecer partes novas para abraçar.

Aos professores, que nos passam todo seu conhecimento e que nos fazem crescer cada dia mais. A esses guerreiros que, mesmo com todas as dificuldades no âmbito educacional que enfrentamos, estão lutando para formar cada dia mais alunos instruídos, meu mais sincero obrigado. São por causa de vocês que seguimos lutando na defesa da educação de qualidade.

Não posso esquecer de agradecer à Universidade Federal de Viçosa, por essa oportunidade e por todo o meu ciclo que termina mais uma vez dentro dela. Foi uma graduação e um mestrado dentro dessa instituição maravilhosa, na qual conheci meus amigos tão queridos. Muito obrigado.

RESUMO

CAMPOS, Caio Motta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2020. **Alterações moleculares por sinais sonoros nas cascatas regulatórias da germinação de sementes.** Orientadora: Flávia Maria da Silva Carmo.

A germinação das sementes pode ser afetada por vários fatores ambientais bióticos e abióticos. Embora já tenhamos conhecimentos científicos acumulados sobre como a maioria desses fatores atua sobre o processo germinativo da maioria das espécies vegetais, ainda não temos total compreensão sobre como diferentes tipos de sons podem se constituir em estímulos negativos ou positivos sobre esse processo. Mais ainda, não compreendemos totalmente quais são as vias de sinalização e resposta molecular e fisiológica elicítadas pelo som. Aqui apresentamos uma revisão do que há de novo na ciência sobre o processo de germinação e indicamos algumas rotas bioquímicas, bem como a ativação/atividade de alguns genes, que são alteradas pelo som, levando à aceleração/aumento do processo de germinação. Nossa investigação sobre a atuação do som na germinação se inicia com a entrada de água através da casca da semente e termina com atividade da α -amilase. Ao final, apontamos rotas metabólicas possivelmente afetadas pelo som e concluímos que o som pode afetar mais de uma rota metabólica que podem ter ação sinérgicas para promover a germinação. A identificação dos mecanismos bioquímicos e moleculares pelos quais o som pode atuar como estímulo positivo sobre o processo germinativo possibilita que tais conhecimentos sejam aplicados, por exemplo, para aumentar ou diminuir a taxa germinativa de espécies alvo. A produção de alimentos, a conservação da biodiversidade e a recuperação de áreas degradadas são exemplos de campos de estudo que podem ser diretamente beneficiados pelas conclusões apresentadas nesse trabalho.

Palavras-chave: Estímulos sonoros. Giberelinas. Canais de cálcio. Genes RAV1. Genes CML38.

ABSTRACT

CAMPOS, Caio Motta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2020. **Biochemical effects of sound in seed germination.** Advisor: Flávia Maria da Silva Carmo.

Seed germination can be affected by many biotic and abiotic environmental factors. Although we already have accumulated scientific knowledge about how the most of these factors act on the germination process of most plant species, we still do not have the entire comprehension about how different types of sound can constitute in negative or positive stimuli on this process. Even more, we do not entirely understand how and which signaling pathway and physiological and molecular pathways are elicited by sound. Here we present a review of what is new in science about the germination process and indicate some biochemical routes, as well as, how is the activation/activity of some genes, that are changed by sound, taking to acceleration/increase of the germination process. Our investigation about the action of the sound on germination starts with the entrance of water between the seed coat and ends with the alpha-amylase activity. In the end, we point metabolic routes affected by sound and conclude that sound can affect more than one metabolic route that can have some synergistic action to promote the germination. The identification of the biochemical and molecular mechanisms for which the sound can act as appositive stimuli on the germinative process enables such knowledge to be applied, for example, to increase or decrease the germination rate of the target species. Food production, conservation of biodiversity and recovery of degraded areas are examples of research fields that can directly benefit from the conclusion presented in this work.

Keywords: Sound stimuli. Gibberellin. Calcium channels. RAV1 genes. CML38 genes.

SUMÁRIO

Porquê estudar inteligência de plantas?	7
A natureza do som	7
Germinação da semente	8
Sons como estímulos para a germinação das sementes	10
Respostas bioquímicas e moleculares das sementes ao som durante a germinação	11
Síntese das giberelinas (GA)	12
Ação da GA	13
Influência do som no processo de germinação	15
Referências	20

Porquê estudar inteligência de plantas?

A questão chave que separa comportamentalmente os reinos animal e vegetal é como eles recebem, distinguem e respondem à estímulos bióticos e abióticos. Os animais são considerados organismo funcionalmente mais complexos principalmente porque apresentam movimentos mais rápidos do que as plantas e podem se comunicar pela emissão de sons (Trewawas, 2014). Porém, estudos recentes apontam que as plantas também são capazes de emitir sons (Khait et al. 2018, Khait et al. 2019). Dessa forma, a ideia de que somente os animais são capazes de se comunicar por meio da emissão de sons é atualmente considerada simplista e não está estritamente correta.

A publicação de ‘A vida secreta das plantas’ (Tompkins & Bird, 1973) proclamando a autoconsciência dos vegetais e do artigo de Brenner e colaboradores propondo a criação de um novo campo de pesquisa em neurobiologia das plantas (Brenner et al. 2006) ilustram que o assunto é controverso. E as recentes publicações dos artigos ‘Plants Neither Possess nor Require Consciousness’ (Taiz et al. 2019) e ‘Plants are intelligent, here’s how’ (Calvo et al 2020) mostram que não há consenso científico sobre como as plantas recebem e processam as informações do ambiente em que estão inseridas. Isso se aplica a todo o seu ciclo de vida, desde o estágio de semente até a reprodução.

Todo o esforço para compreender em profundidade os mecanismos pelos quais os vegetais processam e reagem a estímulos é justificado pela necessidade de quebrar paradigmas e transpor barreiras de conhecimentos sobre a organização estrutural e funcional desses organismos. Esses conhecimentos são importantes para entendermos melhor o surgimento e a complexidade da vida.

A natureza do som

O som é energia acústica na forma de onda mecânica oscilatória, com pressão de choque, que é transmitida através do meio físico. As ondas sonoras e de ruídos propagam-se longitudinalmente e fazem com que o meio vibre paralelamente a elas, como consequência das pequenas mudanças na pressão do ambiente. Embora ambos os sons sejam misturas de ondas acústicas de diferentes frequências, as ondas sonoras são periódicas e regulares, enquanto os ruídos são esporádicos e desordenados. Assim, as mudanças de pressão causadas pelas ondas sonoras são sequencialmente harmônicas, fazendo o meio vibrar ordenadamente, enquanto os

ruídos o fazem vibrar desordenadamente. Portanto, vibrações sonoras podem ter efeitos positivos na energia cinética das moléculas, enquanto os ruídos tem efeitos negativos (Ghosh et al., 2016; Mishra et al. 2016; Khait et al. 2019; Elert, 2020).

A percepção das ondas sonoras por plantas se dá por meio da conexão estrutural entre parede celular–membrana plasmática–citoesqueleto e a associação com moléculas integradoras existentes dentro da célula vegetal, a exemplo do que ocorre em animais (Jaffe et al., 2002; Baluška et al., 2003; Telewski, 2006). Esse sistema é integrado com canais de Ca^+ seletivos (Cosgrove & Hedrich, 1991; Ding & Pickard, 1993; Gens et al., 2000; Dutta & Robinson, 2004; Pickard & Fujiki, 2005) e é sensível a vibrações sonoras em nanoescala. Essas vibrações causam alterações nas plantas de diversas maneiras, seja por indução de respostas imunológicas, respostas de defesa, resposta à estresse ou estimulação de crescimento (Appel & Cocroft, 2014; Hassanien et al. 2014; Jeong, et al., 2014; Fernandez-Jaramillo et al. 2018). Essas modificações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, por sua vez, têm consequências evolutivas e ecológicas (Telewski, 2006; Baluška et al., 2003; Gagliano et al., 2017).

As plantas também produzem sons internamente que podem ser perceptíveis externamente. Existem três tipos de ondas sonoras: as “ondas P” (“ondas de compressão” ou “ondas corporais”), que são ondas produzidas de dentro do substrato e se propagam em formas esféricas; as ondas Rayleigh, que são aquelas produzidas na superfície sólida e se propagam bidimensionalmente pelo sólido em questão; e as ondas de flexão, que são produzidas em estruturas em forma de prato ou bastão, como nas folhas ou caules, e se propagam longitudinalmente a partir da sua fonte (Rodríguez e Desjonquères, 2018).

Germinação da semente

Uma das etapas mais importantes do ciclo de vida dos vegetais é o processo de germinação. Uma vez que ele é levado a termos satisfatórios, há razoável probabilidade de sobrevivência do indivíduo e a população é beneficiada pelo seu crescimento numérico (Crawley, 1997). Embora estejam inseridos dentro das sementes, uma estrutura de proteção e de dispersão, os embriões tanto das monocotiledôneas quanto das dicotiledôneas estão sujeitos à uma série de fatores adversos que podem levá-lo à morte antes da retomar seu desenvolvimento e se tornar uma plântula. Estrategicamente, não há vantagens em permanecer em estágio de dormência.

A germinação é o processo inicial de desenvolvimento das plantas e um dos mais

cruciais relativos à sobrevivência do novo indivíduo, pois no estágio de embrião esse novo indivíduo está mais susceptível às adversidades do meio (Bewley, 1997; Bentsink and Koornneef, 2002; Banerjee et al. 2006; Chauhan, 2013, Zhao, 2015). Caso não haja um *timing* perfeito entre a maturação do embrião, os recursos disponíveis e condições adequadas do meio, a plântula poderá perecer.

A germinação é iniciada pela entrada de água através da casca da semente, desencadeando processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos nas estruturas periféricas e no embrião, que culminam com a protrusão da radícula (Bewley et al., 1997; Nonogaki et al., 2010). Para que esses processos aconteçam satisfatoriamente, condições ambientais como luz e temperatura também devem estar adequadas às exigências do nicho da espécie. Ainda assim, no caso de espécies cujas sementes apresentam dormência, fatores genéticos podem retardar o desenvolvimento do embrião, mesmo quando as condições e os recursos são favoráveis.

O processo de germinação é frequentemente dividido em três fases, de acordo com o conteúdo de água na semente (Bentsink e Koornneef, 2002; Nonogaki et al., 2010; Weitbrecht et al. 2011; Rosental et al., 2014; Liu et al., 2016; Bewley & Nonogaki, 2017; Ma et al., 2017; Nonogaki & Nonogaki, 2017; Savaedi et al., 2019; Tuan et al., 2019). Na fase I ocorre uma rápida entrada de água devido à diferença de potencial osmótico entre a semente e o ambiente externo (Bewley & Nonogaki, 2017; Savaedi et al. 2019). A hidratação das células desencadeia processos de reparação das membranas celulares, especialmente mitocondriais, e do DNA e mRNA. Também há aumento de geração de energia pela biossíntese de novas mitocôndrias e pela ativação das vias glicolítica, da fermentação e do ciclo de Krebs. (Rosental et al., 2014; Bewley & Nonogaki, 2017; Nonogaki & Nonogaki, 2017; Tuan et al., 2019). Na fase 2 há diminuição da diferença de potencial osmótico (Savaedi et al., 2019; Tuan et al., 2019), e consequentemente, a entrada de água é drasticamente reduzida. Nessa fase, há ativação e ou desativação de genes que determinam a síntese de hormônios vegetais, principalmente Giberelina (GA) e Ácido Abscísico (ABA) (Rosental et al., 2014; Bewley & Nonogaki, 2017). Nessa fase a dormência da semente pode ou não ser quebrada, dependendo do balanço das concentrações de ABA e GA, respectivamente inibidor e promotor da germinação. Concentrações mais altas de GA em relação a ABA determinam a superação da dormência (Bewley & Nonogaki, 2017). E a fase 3 é iniciada com a protrusão da radícula do embrião e é também chamada fase pós-germinativa. Durante essa última fase a entrada de água é aumentada devido à absorção pela radícula. Os nutrientes necessários para o desenvolvimento da plântula

até o início do processo fotossintético advêm da mobilização de reservas do endosperma ou dos cotilédones ou de ambos. Polissacarídeos, lipídeos e proteínas são hidrolisados em açúcares e aminoácidos utilizáveis na construção da estrutura da nova planta (Bewley & Nonogaki, 2017; Nonogaki & Nonogaki, 2017).

Sons como estímulos para a germinação das sementes

Até onde temos conhecimento, o primeiro artigo científico relacionando a germinação de sementes com sons audíveis é o de Weinberger & Measures (1968), que reportaram o aumento da taxa da germinação de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) variedade Rideau (de inverno) quando expostas a um som monotônico com frequência de 5 KHz e nível de pressão de 95 dB. Weinberger & Graefe (1973) também mostraram aumento nas taxas de germinação de sementes de feijão e de milho quando submetidas a sons produzidos por humanos cantando ou tocando instrumentos. Mais recentemente, Creath and Schwartz (2004) relataram aumento da taxa de germinação de sementes de quiabo e de abobrinha submetidas à reprodução de sons produzidos por pássaros e Vicienti (2017) reportou o uso de sons audíveis como técnica eficiente de estimulação da germinação de sementes velhas de milho armazenadas em bancos de germoplasma.

Juntamente com o aumento das publicações científicas reportando respostas de plantas a sons de diferentes origens e organizações, os esforços de vários cientistas têm sido direcionados para entender os mecanismos pelos quais os sons alteram a fisiologia e a morfologia desses organismos.

Jeong e seus colaboradores (2008) viram que alguns genes fotossensíveis, mesmo sob condições de ausência de luz, têm suas expressões aumentadas quando expostos a frequências sonoras específicas. Ghosh et al. (2016) exploraram os efeitos do estímulo sonoro de 5 frequências diferentes (250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz e 3000 Hz) sobre a expressão gênica (transcriptomas e proteomas) e mudanças hormonais das plantas e demonstrou que diversos genes de várias rotas biológicas são expressos sob influência de frequências específicas. Também Ghosh et al. (2017) estudaram o efeito específico do som monotônico de 500 Hz e 80 decibéis em plantas de *Arabidopsis* por diferentes períodos de tempo e mostraram que 9 genes, entre eles o RAV1, tiveram sua atividade induzida pelo estímulo sonoro. O RAV1 é um fator de transcrição mecanorreceptor envolvido no processo de germinação.

Hassanien et al. (2014) mostraram que quando expostas a sons algumas espécies de

plantas aumentam a quantidade de mRNA, a atividade de proteínas e conteúdos celulares, bem com sua imunidade geral da planta. Mishra et al. (2016) também mostraram que diversos aspectos da fisiologia das plantas, desde expressões gênicas até mecanismos de resposta à seca, sofrem alterações sob tratamentos sonoros e que essas respostas ao som são cruciais para a sobrevivência das plantas.

Embora sejam esses resultados bastante esclarecedores, muitas questões permanecem ainda sem resposta, principalmente no que tange ao processo de germinação. Podemos ver pelos estudos que o som tem influência, mas qual a importância dele? O que acontece a nível molecular na semente entre a recepção do som e a resposta germinativa final? Quais mecanismos moleculares são ativados? Em quais rotas metabólicas envolvidas no processo de germinação há interferência do som? Essas e outras perguntas ainda permanecem sem respostas.

Desse modo o objetivo do nosso trabalho foi fazer uma revisão sistemática da literatura sobre os mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos na germinação das sementes e apontar as possíveis rotas metabólicas que podem ser alteradas pelo som durante esse processo.

Respostas bioquímicas e moleculares das sementes ao som durante a germinação

A primeira resposta das plantas ao som é o aumento da concentração de cálcio citoplasmático que ocorre como resposta a ativação dos canais de Ca^+ e inclui a ativação de proteínas do tipo calmodulina. Também, segundo Vicient (2017), a vibração sonora modifica estruturalmente as membranas do pericarpo, que tem sua porosidade aumentada. O aumento da porosidade do pericarpo facilita a entrada de água e oxigênio para o endosperma e o embrião. Conseqüentemente, há aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da atividade de enzimas ligadas à degradação das ROS, além de aumento de alguns fitohormônios. Todas essas reações ocorrem como resposta à entrada de água e aumento da pressão parcial de oxigênio internamente às células (Gomes & Garcia, 2013; Rosental, et al. 2014) (Li et al. 2008; Rosental, et al. 2014; Ghosh, et al., 2016; Fenandez-Jaramillo, et al., 2018).

Nas sementes, as ROS são importantes para a sinalização de algumas rotas metabólicas e na quebra da dormência (El-Maarouf-Bouteau e Bailly, 2008; Ishibashi et al., 2012; Gomes e Garcia, 2013). Essas moléculas estão relacionadas ao processo de sinalização da síntese de giberelina e interferem principalmente na produção da α -amilase nas células da camada de aleurona das monocotiledôneas (Ishibashi et al., 2012) e nas células do embrião das

dicotiledôneas.

Síntese das giberelinas (GA)

A rota de produção das giberelinas (GA) se inicia pela síntese do metileritritol fosfato (MEP), na rota dos terpenos, no cloroplasto. O Gliceraldeído-3-fosfato se liga ao piruvato e forma o 1-deóxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP), por meio da enzima DOXP sintase. Esse composto é reduzido, pela enzima DOXP redutase, em MEP e posteriormente em isopentenil difosfato (IPP). O IPP é isômero do dimetialil difosfato e ambos se ligam formando o geranyl difosfato (GPP), que por sua vez se liga a mais duas moléculas de IPP formando o geranylgeranyl difosfato (GGPP). Por meio da enzima *ent*-copalil difosfato sintase o GGPP é transformado em *ent*-copalil difosfato que, posteriormente, é transformado em *ent*-caureno pela enzima *ent*-caureno sintase (Nagegowda & Gupta, 2020). O *ent*-caureno é então transportado para a membrana do cloroplasto onde é transformado em *ent*-caurenol, depois em *ent*-caurenal e por fim em Ácido *ent*-caurenóico; todos esses processos são mediados pela enzima *ent*-caureno oxidase. Esse ácido é então transformado em Ácido *ent*-7-hidroxicaurenóico pela enzima Ácido *ent*-caurenóico oxidase, para então ser transformado pela enzima GA₁₂-aldeído sintase na primeira GA, a GA₁₂-aldeído. Essa é transformada em GA₁₂ pela GA₇-oxidase (Seo et al., 2009; Hedden, 2017; Salazar-Cerezo et al., 2018).

A GA₁₂, precursora das GAs bioativas, pode seguir por duas rotas durante a biossíntese: a hidroxilação do carbono 13 ou a não-hidroxilação do carbono 13. Na primeira a GA₁₂ é transformada em GA₅₃ pela GA₁₃-oxidase, que é então transformada em GA₄₄, GA₁₉ e GA₂₀ subsequentemente pela enzima GA₂₀-oxidase. A GA₂₀ é então transformada em GA₁ pela GA₃-oxidase. Já na segunda rota a GA₁₂ é transformada em GA₁₅, GA₂₄ e GA₉, subsequentemente pela enzima GA₂₀-oxidase e por fim em GA₄ pela enzima GA₃-oxidase (Salazar-Cerezo et al., 2018). Dependendo da espécie, uma ou outra GA bioativa pode ser mais predominante (Yamaguchi & Kamiya, 2002). Após a produção da GA ela é encaminhada para o local de ação.

Em eudicotiledôneas a GA bioativa é sintetizada, principalmente, no córtex do hipocótilo (Yamaguchi e Kamiya, 2002) e em monocotiledôneas é sintetizada no embrião (Lovegrove e Hooley, 2000).

Autores, como Wei et al. (2012), Hassanien et al. (2014) e Ghosh et al. (2016), que trabalharam com ação do som nas plantas, apontaram como um dos resultados o aumento da quantidade de giberelina endógena. Porém o mecanismo pelo qual esse aumento de GA

acontece ainda permanece não elucidado.

Ação da GA

Em monocotiledôneas, a GA é transportada para as células da aleurona onde se liga ao receptor de membrana e é sinalizada via proteína G. As proteínas G compreendem várias famílias de proteínas com diversas funções celulares, entre elas um papel central na transdução de sinal (Zachariou et al. 2012). Quando isso acontece duas ações são iniciadas. A primeira é a ativação de proteínas do tipo calmodulinas que por sua vez serão utilizadas no final da rota de produção de alpha-amilase (Lovegrove & Hooley, 2000). A segunda é a produção de um sinalizador de GA pela proteína G. Esse sinalizador entra no núcleo e liga-se ao *GID1*, uma proteína receptora desse sinalizador de GA. O complexo proteico *sinalizador de GA+GID1* se liga então à *SLN1* (*SLN1* nas sementes de cevada ou *SLR1* nas sementes de arroz). Por sua vez, a *SLN1* é uma proteína do tipo DELLA.

As proteínas DELLAs (ácido aspártico-ácido glutâmico-leucina-leucina-alanina) são um grupo de moléculas de plantas que atuam como reguladores transcricionais específicos negativos na sinalização de giberelina (GA). O mecanismo molecular pelo qual as DELLAs agem na regulação negativa da sinalização de GA é baseado em sua interação com várias proteínas, incluindo fatores transcricionais, que modulam a expressão gênica da GA. Evidências recentes revelaram que um grande número de proteínas que interagem com DELLA também medeia processos de resposta a fatores ambientais, sugerindo que as DELLAs atuam como um nó-chave na integração das respostas hormonais a fatores do meio ambiente (Vera-Sirera, 2016; Salazar-Cerezo et al., 2018).

As proteínas DELLA se ligam à região de transcrição do *GAMyB* (proteína do tipo R2R3-MYB envolvida na regulação da expressão gênica da GA). As DELLA são então poliubiquinadas por meio da proteína F-box e, por fim, degradadas pelo proteossomo 26S (Lovegrove & Hooley, 2000; Gomi & Matsuoka, 2003; Washio & Morikawa, 2006; Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Ueguchi-Tanaka et al., 2007; Sun, 2011; Du et al., 2017; Salazar-Cerezo et al., 2018).

Uma vez que há a degradação das proteínas DELLA, há conseqüentemente a liberação da região de transcrição de *GAMyB* e esse gene é então transcrito livremente. Embora esses passos bioquímicos sejam conhecidos, os processos que ocorrem entre a degradação das proteínas DELLA e a transcrição do *GAMYB*mRNA ainda não são plenamente conhecidos

(Lovegrove e Hooley, 2000; Gomi e Matsuoka, 2003; Washio e Morikawa, 2006).

Segundo Ishibashi et al (2012), as ROS executam as funções de aumentar a produção de GAMyb mRNA e de inibir a produção de mRNA-ABA-responsive protein kinase (PKABA mRNA), tendo essa última a função de regulação positiva do ABA. A PKABA é uma proteína do tipo Sucrose nonfermenting 1-related protein kinase (SnRK2) cuja atividade enzimática reprime a indução da expressão de GAMYB. Então, as ROS aumentam a produção de GAMYB e indiretamente, concomitantemente, diminuem a produção de PKABA (Gómez-Cadenas et al., 1999; Gómez-Cadenas et al., 2001; Feng et al., 2014).

Na presença de som, o gene RAV1, que atua durante a germinação, na regulação negativa dos genes ABI3, ABI4, ABI5 (Feng et al., 2014), tem sua expressão aumentada (Ghosh et al., 2016). Os genes ABIs são responsáveis pela sinalização do ABA, pela sensibilidade a esse hormônio e também pelo *de-greening* do embrião (Chang et al., 2018; Nonogaki, 2019) Ainda no artigo de Feng et al. (2014) é visto que o gene RAV1 é suprimido por meio de fosforilação pelas proteínas da família SnRK2.

Com o bloqueio da sinalização do ABA, o GAMYB-mRNA é então enviado ao citosol da célula onde será produzido o fator de transcrição GAMYB. Esse é enviado de volta ao núcleo e se liga à GARE (elementos de resposta à GA). Essa ligação leva então à transcrição do α -amilase mRNA, que é enviado ao retículo endoplasmático rugoso onde irá ser produzida a α -amilase (Szewinska et al., 2016). A α -amilase é a enzima responsável pela catalização da hidrólise de ligações glicosídicas do tipo α -D-(1,4) do amido. Essa enzima é empacotada no complexo de Golgi e secretada pela célula por meio de vesículas dependentes de Ca^{2+} para desempenhar a função de degradação do amido em monossacarídeos que serão utilizados como fonte de energia para o desenvolvimento do embrião (Lovegrove e Hooley, 2000).

Interessantemente, também há aumento do Ca^{2+} citosólico como uma resposta ao som. O cálcio é um conhecido íon de resposta ao estresse e às variações sonoras bióticas e abióticas (White, 1998; White, 2000; Fenandez-Jaramillo, et al., 2018). E adicionalmente, há aumento na expressão do gene CML38 pelo som. Esse gene é responsável pela codificação de uma proteína dependente de Ca^{2+} do tipo calmodulina (Ghosh et al., 2016). O CML38 está presente em várias partes da planta, incluindo na semente e a calmodulina expressa por ele é a principal proteína de resposta, ligada ao cálcio, quando a planta está em estresse por hipóxia, o que acontece no início da germinação (Rosental et al. 2014, Lokdarshi et al., 2016)

Influência do som no processo de germinação

Em resumo, o som afeta alguns pontos chave das rotas bioquímicas envolvidas na germinação das sementes. As principais rotas afetadas são as da síntese e ativação da enzima α -amilase, responsável pela degradação de reservas e disponibilização desses recursos para o embrião. Dessa forma, o som atua diretamente no aumento do suprimento de energia necessária para a ativação das atividades fisiológicas que levam ao desenvolvimento do embrião e à germinação das sementes.

No tocante à síntese da α -amilase, o som atua especificamente no aumento das ROS, que por sua vez sinalizam a síntese da GA. O aumento da concentração da GA leva à degradação da proteína DELLA, que é um bloqueador do gene que determina a síntese de GAMyb. Com a liberação desse gene, há produção do GAMybmRNA. O GAMyb, por sua vez, é responsável pela síntese da α -amilase mRNA e, em consequência, pela síntese dessa enzima.

Concomitantemente, a PKABA, outra proteína que inibe o GAMyb mRNA de ser sintetizado, é reprimida por 2 rotas afetadas pelo som: a rota do RAV1 e a rota das ROS. Com aumento da expressão do RAV1 pelo som, a PKABA é reprimida indiretamente pela diminuição da sensibilidade ao ABA. Já o aumento da concentração intracelular das ROS como consequência da exposição à frequências sonoras diferentes, reprime diretamente a PKABA. Além disso, as ROS atuam diretamente no aumento da síntese de GAMyb mRNA, mas somente após a degradação da proteína DELLA, como foi descrito acima.

O som também atua no processo de germinação das sementes promovendo o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular de três maneiras diferentes. A primeira é pelo aumento do Ca^{2+} citosólico a partir de outras fontes (vacúolo, espaço intercelular). O segundo é por meio do aumento da expressão do gene CML38, um gene responsável pela produção de calmodulinas. E um terceiro ponto é o aumento da GA que, além de ser responsável pela síntese de α -amilase, atua também na ativação das calmodulinas das células. Ou seja, o aumento da GA promove o aumento do influxo de Ca^{2+} que será usado na secreção da α -amilase. A secreção da α -amilase é dependente do íon Ca^{2+} no citosol da célula, geralmente proveniente do influxo mediado por GA e por proteínas do tipo calmodulinas, a partir do vacúolo.

Take home messages

Com a exposição ao som, a semente passa por um processo de absorção de água mais rápido que o natural, devido à modificação estrutural do pericarpo. Esse aumento na absorção

poderia causar um estresse por hipóxia? Pensando nesse ponto, o gene CML38, que sintetiza proteínas de bombeamento de cálcio (calmodulina), que aumenta a expressão com o som, é a principal via de regulação de hipóxia, tendo sua expressão aumentada nesses casos. Esse gene, CML38, teria sua expressão e síntese de calmodulinas duplamente aumentada pelo som (diretamente e indiretamente, via aumento da hipóxia)? As calmodulinas permitem a liberação da α -amilase nos tecidos de reserva da semente. A α -amilase é super expressa por diferentes rotas estimuladas pelo som, como visto no texto. Então o principal efeito do som sobre a germinação das sementes pode ser no aumento da expressão, liberação e atividade da enzima α -amilase, o que por sua vez promoveria o aumento da velocidade de germinação.

Concomitantemente, o som aumenta a expressão de RAV1 que leva à inibição dos fatores de transcrição ABI, responsáveis por aumentar a sensibilidade dos tecidos ao ABA. Desse modo, a sensibilidade ao ABA se tornaria muito baixa quando a semente é exposta ao som, causando um aumento nas taxas de germinação pela redução da atividade do ABA.

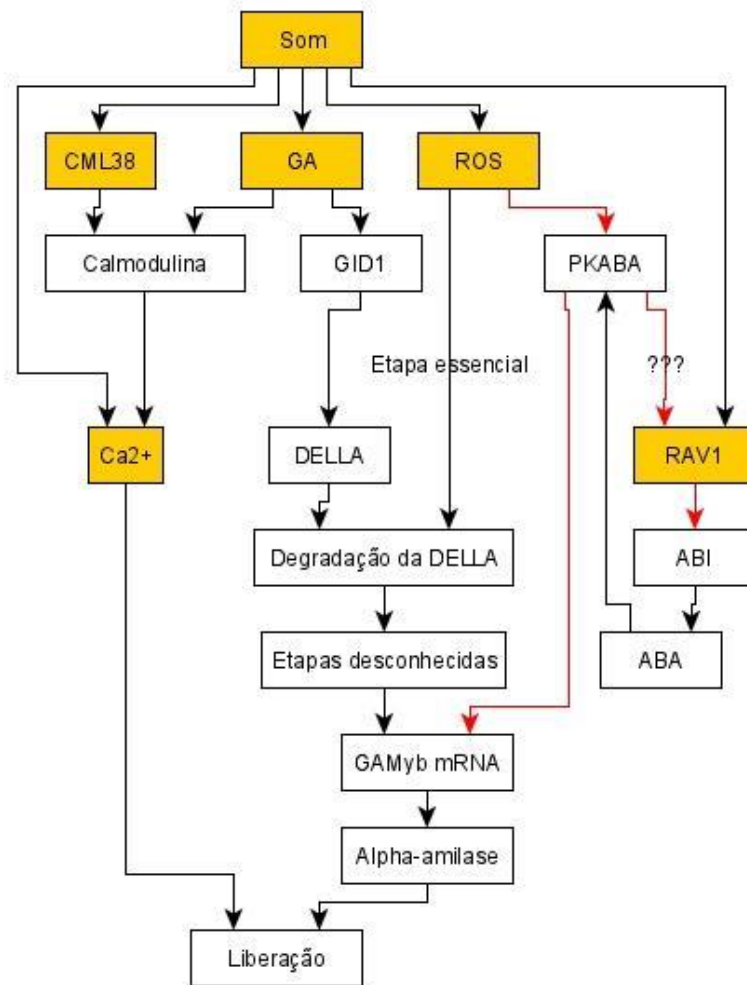


Figura 1: Ação do som sobre a rota da germinação de sementes. Setas vermelhas: Inibição. Setas Pretas: Ativação e síntese.

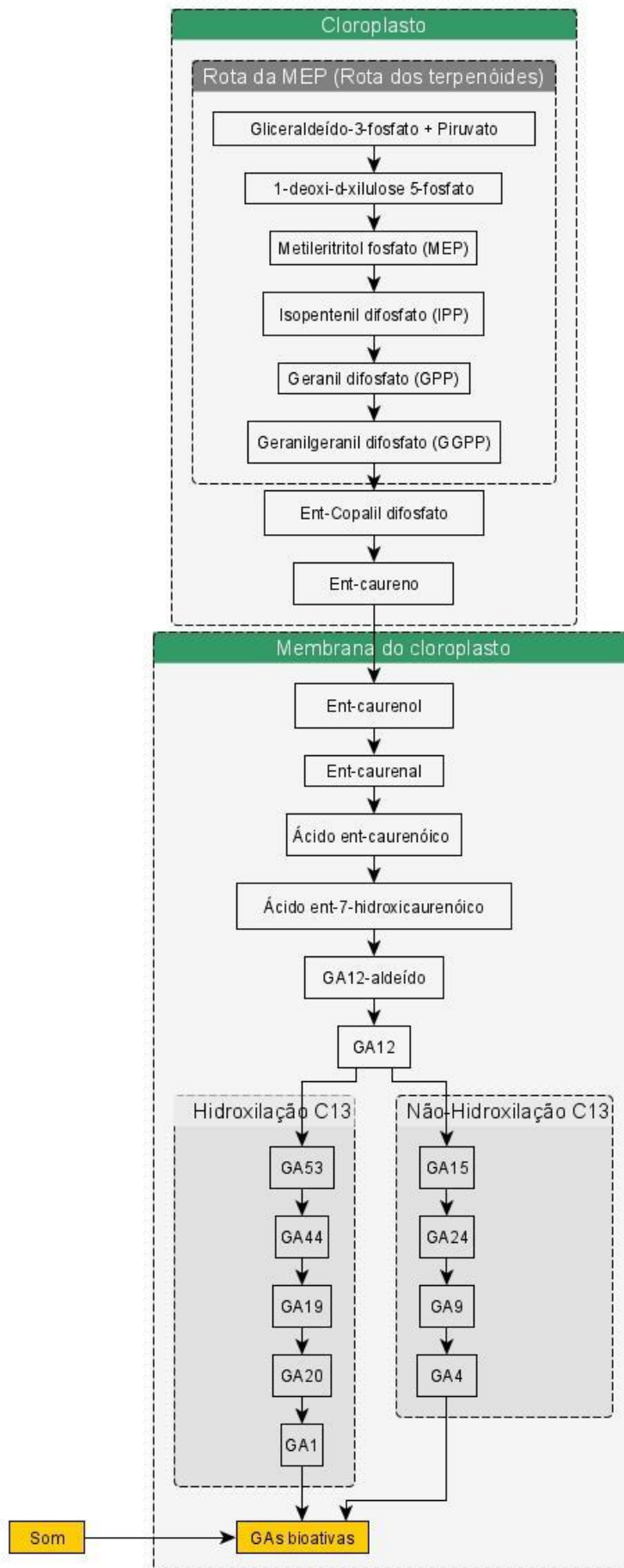


Figura 2: Rota de síntese das giberelinas (GA) bioativas com ênfase na ação do som.

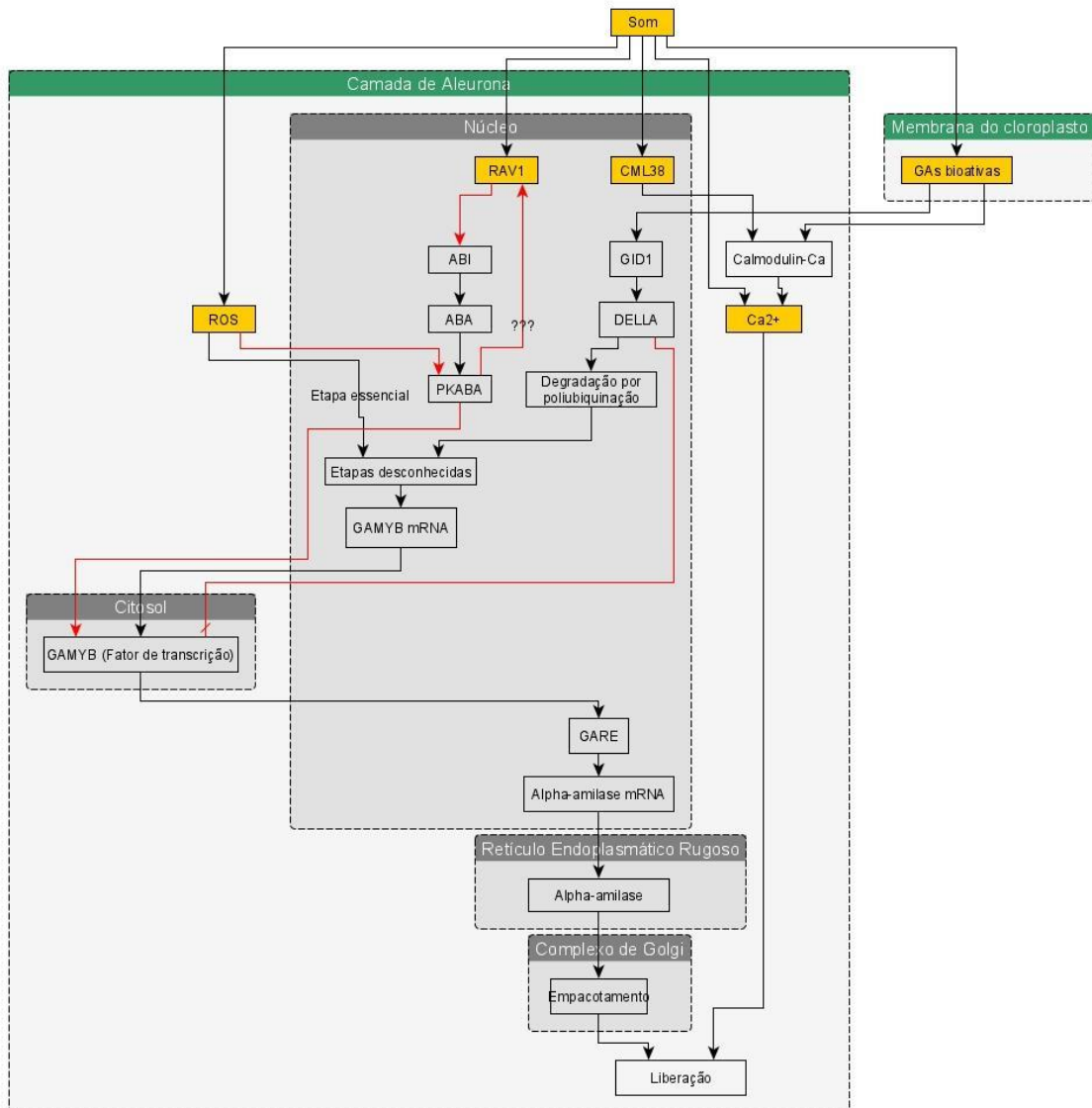


Figura 3: Rota da germinação. Caixas amarelas: Ação do som. Setas vermelhas: Inibição. Setas pretas: Ativação e/ou síntese.

REFERÊNCIAS

- Appel, H.M. and Cocroft, R.B. (2014) Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing. *Oecologia*. 175, 1257-1266.
- Baluška, F. et al. (2003) Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall Continuum in Plants. *Emerging Links Revisited*. *Plant Physiol.* 133, 482-491.
- Banerjee, M.J. et al. (2006) Native Plant Regeneration on Abandoned Desert Farmland: Effects of Irrigation, Soil Preparation, and Amendments on Seedling Establishment. *Restor. Ecol.* 14, 339-348.
- Bentsink, L. and Koornneef, M. (2002) Seed Dormancy and Germination. *The Arabidopsis Book*. (Somerville, C. and Meyerowitz, E., eds). Pp. 33-36. The American Society of Plant Biologists.
- Bewley, J.D. (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*. 9, 1055-1066.
- Bewley, J.D. and Nonogaki, H. (2017) Seed Maturation and Germination. Reference Module in Life Science. (Roitberg, B. D.) Pp. 623-626. Elsevier.
- Brenner, E. D. et al. (2006) Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends Plant Sci.* 11, 413-419.
- Calvo, P. et al. (2020) Plants are intelligent, here's how. *Ann. Bot-London*. 125, 11-28.
- Chang, G. et al. (2018) AFP2 as the novel regulator breaks high-temperature-induced seeds secondary dormancy through ABI5 and SOM in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 501, 232-238.
- Chauhan, B.S. (2013) Seed Germination Ecology of Feather Lovegrass [*Eragrostis tenella* (L.) Beauv. Ex Roemer & J.A. Schultes]. *Plos One*. 8, 79398.
- Cosgrove, D. J. e Hedrich, R. (1991) Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta*. 186, 143-153.
- Crawley, M. J. (1997) *Plant Ecology*. Blackwell.
- Creath, K and Schwartz, G.E. (2004) Measuring Effects of Music, Noise, and Healing Energy Using a Seed Germination Bioassay. *J. Altern. Complem. Med.* 10, 113-122.
- Ding, J. P. e Pickard, B. G. (1993) Mechanosensory Calcium-Selective Cation Channels in Epidermal Cells. *Plant J.* 3, 83-110.

- Du, R. et al. (2017) The gibberellin GID1-DELLA signalling module exists in evolutionarily ancient conifers. *Sci. Rep.* 7, 16637.
- Dutta, R. e Robinson, K. R. (2004) Identification and Characterization of Stretch-Activated Ion Channels in Pollen Protoplasts. *Plant Physiol.* 135, 1398-1406.
- Elert, G. (2020). The nature of sound. In. (Glenn Elert) The physics hypertextbook. <https://physics.info/sound/>
- El-Maarouf-Bouteau, H. and Bailly, C. (2008) Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal. Behav.* 3, 175-182.
- Feng, C. et al. (2014) Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development. *Plant J.* 80, 654-668.
- Fernandez-Jaramillo, A.A. et al. (2018) Effects of acoustic waves on plants: An agricultural, ecological, molecular and biochemical perspective. *Sci. Hortic-Amsterdam.* 235, 340-348.
- Gagliano, M. et al. (2017) Tuned in: plant roots use sound to locate water. *Oecologia.* 184, 151-160.
- Gens, J. S. et al. (2000) Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. *Protoplasma.* 212, 115-134.
- Ghosh, R. et al. (2016) Exposure to Sound Vibrations Lead to Transcriptomic, Proteomic and Hormonal Changes in Arabidopsis. *Sci. Rep-UK.* 6, 33370.
- Ghosh, R. et al. (2017) Expression Analysis of Sound Vibration-Regulated Genes by Touch Treatment in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 8, 100.
- Gomes, M. e Garcia, Q. (2013) Reactive oxygen species and seed germination. *Biologia.* 68, 351-357.
- Gómez-Cadenas, A. et al. (1999) An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Plant Biol.* 96, 1767-1772.
- Gómez-Cadenas, A. et al. (2001) Gibberellin/Abscisic Acid Antagonism in Barley Aleurone Cells: Site of Action of the Protein Kinase PKABA1 in Relation to Gibberellin Signaling Molecules. *The Plant Cell.* 13, 667-679.
- Gomi, K. e Matsuoka, M. (2003) Gibberellin signalling pathway. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 489-493.
- Hassanien, R.H.E. et al. (2014) Advances in Effects of Sound Waves on Plants. *J. Integr. Agr.* 13, 335-348.

- Hedden, P. (2017) Gibberellins. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. (2nd edn) (Thomas, B., Murray, B.G., Murphy, D.J. eds) pp. 509-512. Academic Press.
- Ishabashi, Y. et al. (2012) Reactive Oxygen Species Are Involved in Gibberellin-Abscisic Acid Signaling in Barley Aleurone Cells. *Plant Physiol.* 158, 1705-1714.
- Jaffe, M. J., Leopold, A. C., and Staples, R. A. 2002. Thigmo responses in plants and fungi. *American Journal of Botany* 89: 375–382
- Jeong, M. et al. (2008) Plant gene responses to frequency-specific sound signals. *Mol. Breeding*. 21, 217-226.
- Jeong, M. et al. (2014) Sound frequencies induce drought tolerance in rice plant. *Pak. J. Bot.* 46, 2015-2020.
- Khait, I. et al. (2018) The sounds of plants – Plants emit remotely-detectable ultrasounds that can reveal plant stress. doi.org/10.1101/507590
- Khait, I. et al. (2019) Sound perception in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 92, 134-138.
- Li, B. et al. (2008) Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum*. *Colloid. Surface. B.* 63, 269-275.
- Liu, S. et al. (2016) Identification of embryo proteins associated with seed germination and seedling establishment in germinating rice seeds. *J. Plant. Physiol.* 196-197, 79-92.
- Lokdarshi, A. et al. (2016) Arabidopsis CML38, a Calcium Sensor That Localizes to Ribonucleoprotein Complexes under Hypoxia Stress. *Plant Physiol.* 170, 1046-1059.
- Lovegrove, A. and Hooley, R. (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* 5, 102-110.
- Ma, Z. et al. (2017) Cell signaling mechanisms and metabolic regulation of germination and dormancy in barley seeds. *The Crop Journal.* 5, 459-477.
- Mishra, et. al. (2016) Plant acoustics in the search of a sound mechanism for sound signaling in plants. *J. Exp. Bot.* 67, 4483-4494.
- Nagegowda, D e Gupta, P. (2020) Advances in the biosynthesis, regulation, and metabolic engineering of plant specialized terpenoids. *Plant Sci.* 294, 110457.
- Nonogaki, H. (2019) ABA responses during seed development and germination. *Adv. Bot. Res.* 192, 171-217.
- Nonogaki, H. et al. (2010) Germination—Still a mystery. *Plant Sci.* 179, 574-581.
- Nonogaki, M. e Nonogaki, H. (2017) Germination. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. (2nd edn) (Thomas, B., Murray, B.G., Murphy, D.J. eds) pp. 509-512. Academic Press.

- Pickard, B. G. e Fujiki, M. (2004) Ca²⁺ pulsation in BY-2 cells and evidence for control of mechanosensory Ca²⁺-selective channels by the plasmalemmal reticulum. *Funct. Plant Biol.* 32, 863-879.
- Rodriguez, R. e Desjonquères, C. (2018) Vibrational Signals: Sounds Transmitted Through Solids. *Encyclopedia of Animal Behavior* (2nd edition) (Choe, J. C.), pp 508-517. Academic Press.
- Rosental, L. et al. (2014) Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Sci. Res-UK.* 24, 1-15.
- Salazar-Cerezo, et al. (2018) Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiol. Res.* 208, 85-98.
- Savaedi, Z. et al. (2019) The role of light and Gibberellic Acid on cardinal temperatures and thermal time required for germination of Charnushka (*Nigella sativa*) seed. *Ind. Crop. Prod.* 132, 140-149.
- Seo, M. et al. (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol. Biol.* 69, 463-472.
- Sun, T. (2011) The Molecular Mechanism and Evolution of the GA–GID1–DELLA Signaling Module in Plants. *Curr. Biol.* 21, 338-345.
- Szewinska, J. et al. (2016) The roles of cysteine proteases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds. *J. Plant. Physiol.* 207, 10-21.
- Taiz, L. et al. (2019) Plants Neither Possess nor Require Consciousness. *Trends Plant Sci.* 24, 677-687.
- Telewski, F. (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am. J. Bot.* 93, 1466-1476.
- Tompkins, P. e Bird, C. (1973) *The Secret Life of Plants*. Harper & Row.
- Trewawas, A. (2014) *Plant Behaviour and Intelligence*. Oxford University Press.
- Tuan et al. (2019) Molecular mechanisms of seed germination. *Sprouted Grains*. (Feng, H., Nemzer, B., DeVries, J.W. eds) pp. 1-24. Woodhead Publishing and AACC International Press.
- Ueguchi-Tanaka, M. et al. (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature.* 437, 693-698.
- Ueguchi-Tanaka, M. et al. (2007) Molecular Interactions of a Soluble Gibberellin Receptor, GID1, with a Rice DELLA Protein, SLR1, and Gibberellin. *Plant Cell.* 19, 2140-2155.

- Vera-Sirera, F. et al. (2016) DELLA Proteins, a Group of GRAS Transcription Regulators that Mediate Gibberellin Signaling. *Plant Transcription Factors*. (Gonzalez, D. H.), pp. 313-328. Academic Press.
- Vicient, C. (2017) The effect of frequency-specific sound signals on the germination of maize seeds. *BMC Re. Notes*. 10, 323.
- Washio, K. e Morikawa, M. (2006) Common mechanisms regulating expression of rice aleurone genes that contribute to the primary response for gibberellin. *Biochim. Biophysica Acta*. 1759, 478-490.
- Wei, M. et al. (2012) Enhancement of the differentiation of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* to shoots by ultrasound treatment. *J. Plant Physiol.* 169, 770-774.
- Weinberger, P. e Graefe, U. (1973) The effect of variable-frequency sounds on plant growth. *Can. J. Bot.* 51, 1851-1856.
- Weinberger, P. e Measures, M. (1968) The effect of two audible sound frequencies on the germination and growth of a spring and winter wheat. *Can. J. Bot.* 46, 1151 (1968).
- Weitbrecht, K. et al. (2011) First off the mark early seed germination. *J. Exp. Bot.* 62, 3289-3309.
- White, P. (1998) Calcium Channels in the Plasma Membrane of Root Cells. *Ann. Bot-London*. 81, 173-183.
- White, P. (2000) Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophysica Acta*. 1465, 171-189.
- Yamaguchi, S. e Kamiya, Y. (2002) Gibberellins and light-stimulated germination. *J. Plant Growth Regul.* 20, 369-376.
- Zachariou, V. et al. (2012) G proteins. *Basic Neurochemistry* (8th edition). (Albers, R. W., Siegel, G. J. e Brady, S.), pp. 411-422, Academic Press.
- Zhao, L. et al. (2015) Relationship of *Sophora davidii* seed size to germination, dormancy, and mortality under water stress. *S. Afr. J. Bot.* 99, 12-16.