

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

CARMEN ROGÉLIA FARIAS MACHADO LIMA

**ATIVIDADE RIBONUCLEÁSICA DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP DURANTE A
GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA: DISTRIBUIÇÃO NOS
ÓRGÃOS, PROPRIEDADES CINÉTICAS E EFEITOS DA SALINIDADE NA
ATIVAÇÃO**

FORTALEZA - CEARÁ

2003

CARMEN ROGÉLIA FARIAS MACHADO LIMA

ATIVIDADE RIBONUCLEÁSICA DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP DURANTE A GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA: DISTRIBUIÇÃO NOS ÓRGÃOS, PROPRIEDADES CINÉTICAS E EFEITOS DA SALINIDADE NA ATIVAÇÃO

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

ORIENTADOR: ENÉAS GOMES FILHO

FORTALEZA - CEARÁ

2003

L697a

Lima, Carmen Rogélia Farias Machado

Atividade Ribonucleásica de *Vigna unguiculata* (L.) Walp durante a Germinação e estabelecimento da plântula: distribuição nos órgãos, propriedades cinéticas e efeitos da salinidade na ativação. / Carmen Rogélia Farias Machado Lima.

101 f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

Tese(Doutorado) Bioquímica Vegetal

Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

1.Feijão-de-corda – Crescimento 2. Salinidade 3.Análise cromatográfica 4.Eletroforese Gomes Filho, Enéas II. Título

CDD 574.192

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica**, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Carmen Rogélia Farias Machado Lima

Tese aprovada em 18 de Março de 2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho
(Universidade Federal do Ceará)

Profª. Dra. Maria da Guia Silva Lima
(Universidade Federal do Ceará)

Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda
(Universidade Federal do Ceará)

Profª. Dra. Cláudia Ferreira Santos
(Universidade Estadual do Ceará)

Dr. Marlos Alves Bezerra
(Embrapa Agroindústria Tropical)

FORTALEZA – CE
2003

Às minhas filhas
Carla e Carolina,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível graças à colaboração de várias pessoas e instituições. Agradeço em especial:

Ao Prof. Enéas Gomes Filho, por sua paciência e correta orientação na elaboração deste trabalho, sobretudo por sua amizade, verdadeiro presente que me foi concedido pelo destino, durante minha formação acadêmica;

Ao Prof. Claudivan Feitosa de Lacerda, por sua competência e amizade, bem como pelas valiosas sugestões apresentadas na revisão do texto e participação na banca de defesa.

Ao Prof. Marlos Alves Bezerra, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, pelas sugestões apresentadas e por aceitar o convite para participar da banca de defesa.

À Prof. Maria da Guia Silva Lima por sua disponibilidade, interesse e contribuição nos ensaios de ELISA e pelo aceite em participar da banca de defesa.

À Profa. Cláudia Ferreira Santos por ter aceito o convite para participar da banca e pelas sugestões apresentadas na revisão do texto.

Ao Prof. José Tarquínio Prisco por sua contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e, sobretudo, por sua amizade e sabedoria.

Aos amigos Hélio e Ana Cláudia por terem me ajudado incondicionalmente nas eletroforeses de DNA e ensaios de ELISA, respectivamente.

Aos amigos Paulo Henrique e Lorena Gama pelos anos de amizade e pela contribuição na realização deste trabalho.

À amiga Elane Carvalho Guerra pelo incentivo, amizade e companheirismo.

Aos amigos Osmundo Brilhante e Octávio Franco, que mesmo ausentes ofereceram sua ajuda e amizade.

Aos bolsistas e alunos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial José Vieira, Jand Venes, Daniel Lobo, Carlos Eduardo e André Azevedo, pelo apoio, por proporcionarem horas de descontração tão necessárias, e pela colaboração em muitos momentos.

Às amigas Isabella, Lourdinha e Edna pelo encorajamento e pelo incansável espírito de ajuda.

Meus agradecimentos à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Alexssandra, Leiliane, Érica, Verônica, Márcia, ao Eduardo, Daniel, e às secretárias do Departamento Gildemar e Marisa.

À minha família, pela presença nas horas mais difíceis e nas alegrias, pela compreensão e carinho a mim dedicados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	13
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Justificativa	17
1.2. Objetivos	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. O feijão-de-Corda	21
2.2. Nucleases, RNases, DNases e Exonucleases	22
2.3. Salinidade	24
2.3.1. Conceito e aspectos gerais	24
2.3.2. Efeitos no metabolismo	26
2.3.3. Efeitos na atividade enzimática	28
2.3.4. Efeitos na expressão gênica	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Material Vegetal	31
3.2. Animais	31
3.3. Condições de Germinação	31
3.4. Medidas de Crescimento	32
3.5. Extração e Precipitação com Sulfato de Amônio	32
3.6. Determinação de Proteína	33
3.7. Purificação da Enzima	35
3.7.1. Cromatografia em CM-Celulose	35
3.7.2. Cromatografia em DEAE-Sephadex A-25	36
3.7.3. Cromatografia em Sephadex G-50	36
3.8. Atividade Ribonucleásica	37
3.8.1. Por medidas de absorbância em 260 nm	37
3.8.2. Por eletroforese para detecção de isoenzimas de RNase	38
3.9. Atividade Desoxirribonucleásica	39
3.9.1. Por medidas de absorbância em 260 nm	39

3.9.2. Por eletroforese para detecção de DNA	40
3.9.3. Efeito dos efetores: EDTA, MgCl ₂ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ e Zn ²⁺ na atividade desoxirribonucleásica	41
3.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS	42
3.11. Imunização dos Camundongos	42
3.11.1. Obtenção dos Antissoros	43
3.12. Ensaio de Elisa (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	43
3.13. Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva	45
4. RESULTADOS	46
4.1. Medidas de Crescimento	46
4.2. Teor de Proteína e Atividade Ribonucleásica	50
4.3. Purificação da RNase	54
4.4. Ensaio de Elisa	58
4.5. Detecção de RNase por Anafilaxia Cutânea Passiva	62
4.6. Isoenzimas de RNase	65
4.7. Atividade Desoxirribonucleásica das Frações F ₄₅₋₇₅ , F _{CM} e F _{G50}	65
4.7.1. Pelas leituras de A ₂₆₀	65
4.7.2. Por eletroforese em gel de agarose	68
4.7.2.1. Em frações F _{CM} com mesmas unidades de atividade (UA)	71
4.7.2.2. Efeito do EDTA e do MgCl ₂ na atividade desoxirribonucleásica das frações F _{CM} e F _{G50}	71
4.7.2.3. Efeito dos íons Cu ²⁺ , Hg ²⁺ e Zn ²⁺ sobre a atividade desoxirribonucleásica da fração F _{G50}	77
4.7.2.4. Efeito da concentração de RNA na atividade desoxirribonucleásica da fração F _{G50}	77
4.7.2.5. Efeito da fração F _{G50} sobre o DNA circular	80
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÕES	91
7. LITERATURA CITADA	92

LIMA, C. R. F. M. ATIVIDADE RIBONUCLEÁSICA DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP DURANTE A GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLÂNTULA: DISTRIBUIÇÃO NOS ÓRGÃOS, PROPRIEDADES CINÉTICAS E EFEITOS DA SALINIDADE NA ATIVAÇÃO.

RESUMO

Para realização deste trabalho, sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] Pitiúba foram semeadas em água destilada (controle) e em presença de NaCl 0,1 M (tratamento salino). Como resultado observou-se que a salinidade inibiu o crescimento das plântulas, bem como inibiu a mobilização das reservas cotiledonárias para as outras partes da plântula. O estudo sobre os efeitos da salinidade nas atividades ribonucleásicas total e específica, em extratos de cotilédones, mostrou que embora tais atividades tenham se apresentado com valores crescentes durante os primeiros dias após a semeadura, o estresse salino reduziu a atividade ribonucleásica específica e provocou um retardamento na atividade total. Os teores de proteína determinados nesses extratos mostraram que a mobilização desta reserva foi fortemente reduzida pela salinidade, principalmente nos 3^o e 5^o dias após a semeadura, embora no último dia do período experimental esses valores tenham sido os mesmos tanto em condições controle como de estresse salino. Para realização dos estudos imunoquímicos, purificou-se a RNase a partir do extrato bruto de cotilédones de plântulas com cinco dias após a semeadura em água destilada. A enzima foi purificada por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio (fração F₄₅₋₇₅), seguida de purificações em colunas de CM-Celulose (fração F_{CM}), DEAE-Sephadex A-25 (fração F_{DEAE}) e Sephadex G-50 (fração F_{G50}). Esta última fração, quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, apresentou-se como uma única banda com massa molecular de 16,3 kDa. Para a produção de anticorpos específicos contra a RNase, camundongos "swiss" foram imunizados com a fração F_{G50} extraída do gel de poliacrilamida, após eletroforese em presença de SDS. Os resultados dos testes de ELISA mostraram que a RNase pré-existe nos cotilédones de sementes quiescentes numa forma inativa (ou de baixa atividade) e que a mesma é ativada durante a germinação e estabelecimento da plântula. Dessa forma, pode-se concluir que a salinidade diminui a atividade ribonucleásica porque afeta o processo de ativação da enzima e não por que afeta sua síntese *de novo*. Também, os testes de ELISA mostraram que as RNases de raízes, caules e folhas são, do ponto de vista imunológico, idênticas àquela dos cotilédones, sendo tais resultados confirmados por anafilaxia cutânea passiva (PCA). O estudo sobre a capacidade das frações F₄₅₋₇₅ e F_{CM} das diversas partes da plântula (raízes, caules, folhas e cotilédones) de hidrolisarem o DNA linear, medida pelas leituras de absorbância em 260 nm dos produtos de hidrólise, mostrou uma pequena atividade desoxirribonucleásica (quando comparada com a atividade ribonucleásica) na F₄₅₋₇₅ e apenas traços dessa atividade na F_{CM}. Contudo, utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose para detecção de DNA, ou de seus produtos de hidrólise, foi claramente detectada atividade desoxirribonucleásica nas F_{CM} oriundas das várias partes da plântula. De modo geral, as

atividades desoxirribonucleásicas dessas frações foram inibidas por EDTA e estimuladas por $MgCl_2$, principalmente, aquela de cotilédones, sugerindo a existência nessas preparações de nucleases ou de uma mistura de RNase com nucleases e/ou DNases. A fração mais purificada da enzima cotiledonária (F_{G50}) também apresentou atividade desoxirribonucleásica, sendo na realidade uma nuclease e não uma RNase. Esta enzima foi inibida por EDTA e pelos íons Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} , sendo contudo estimulada por $MgCl_2$. A atividade desoxirribonucleásica da fração F_{G50} foi inibida por concentrações crescentes de RNA na mistura de reação, sugerindo a existência de uma competição deste substrato com o DNA pelo mesmo centro ativo da enzima. Além disso, o fato da fração F_{G50} ter se mostrado capaz de hidrolisar o DNA circular (plasmídeo), demonstra que a enzima é especificamente uma endonuclease. Portanto, a RNase purificada de cotilédones de *Vigna unguiculata* é na realidade uma nuclease que apresenta uma afinidade por RNA muito maior que aquela por DNA.

Palavras-chave: crescimento, DNase, efetores, imunológica, nuclease, RNase, salinidade, *Vigna unguiculata*.

LIMA, C. R. F. M LIMA, C. R. F. M. RIBONUCLEASE ACTIVITY DURING GERMINATION AND ESTABLISHMENT OF THE *Vigna unguiculata* (L.) WALP SEEDLING: DISTRIBUTION IN ORGANS, KINETIC PROPERTIES AND EFFECTS OF SALINITY ON ACTIVATION.

ABSTRACT

In this work, Pitiúba cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] seeds were sown in distilled water (control treatment) or in 0.1M (salt treatment). The results showed that salinity inhibited growth and cotyledon reserve mobilization to others seedling parts. The study on salinity effect on total and specific RNase activities in cotyledon extract showed that although activities increased during the first days after sowing, saline stress reduced the specific RNase activity and caused a delay in the total activity. The protein extract content showed that reserve mobilization was strongly decreased by salinity, mainly on the 3rd and 5th days after sowing although in the last experimental day these values were the same for control and salt-stressed seedlings. To carry out the immunological studies, RNase was purified from the crude extract from cotyledons of seedlings (5 days after sowing). The enzyme was purified by extract precipitation using ammonium sulfate (fraction F₄₅₋₇₅), following purification through CM-Celulose (fraction F_{CM}), DEAE-Sephadex A-25 (fraction F_{DEAE}) and Sephadex G-50 (fraction F_{G50}) columns. The latter fraction was submitted to a SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and showed a unique band with molecular mass of 16.3 kDa. For specific RNase antibodies production, "swiss" mice were immunized with F_{G50} fraction extracted from polyacrylamide gel after SDS-electrophoresis. The ELISA test showed that RNase is also present in cotyledon of quiescent seeds as an inactive form (or low activity) and it is activated during germination and seedling establishment. So, it indicates that salinity reduces RNase activity due to enzyme activation and not through *de novo* synthesis. The ELISA tests also showed that roots, stem and leaves RNases are similar to the cotyledons from an immunological point of view and these results were confirmed by the passive cutaneous anaphylaxis (PCA). The study concerning linear DNA hydrolytic capacity of F₄₅₋₇₅ fractions from several seedling parts (roots, stem, leaves and cotyledons) was evaluated through measurements of the hydrolysis product absorbance at 260 nm and results showed a lower DNase activity (as compared to RNase activity) and only traces of this activity in the F_{CM}. Nevertheless, using the electrophoresis agarose gel to detect DNA or hydrolysis product, DNase activity was clearly detected in F_{CM} fractions from the several parts of the seedling. In the general, the DNase activity of these fractions was inhibited by EDTA and stimulated by MgCl₂, mainly those in cotyledons, suggesting the existence of nucleases or a mixture of RNase and nucleases and/or DNases in these samples. The most purified fraction of cotyledonary enzyme (F_{G50}) also showed DNase activity, being in reality, a nuclease and not an RNase. This enzyme was inhibited by EDTA and by Cu²⁺, Hg²⁺ and Zn²⁺ ions, but stimulated by MgCl₂. The DNase activity from the F_{G50} fraction was inhibited by increasing concentrations of RNA in the reaction mixture, suggesting the existence of a competition

between RNA and DNA by the enzyme active center. Indeed, the fact of F_{G50} fraction showed circular DNA (plasmid) hydrolytic capacity, it demonstrates that enzyme is specifically an endonuclease. Therefore, a purified cotyledon RNase from *Vigna unguiculata* is in reality a nuclease that shows a higher affinity by RNA than DNA.

Keywords: DNase, effectors, growth, immunoassays, nuclease, RNase, salinity, *Vigna unguiculata*.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1.	Purificação da RNase extraída de cotilédones, raízes, caules e folhas de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada	59
Tabela 2.	Atividade enzimática das frações F_{45-75} e F_{CM} de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba em relação aos substratos RNA e DNA	67
Tabela 3.	Efeito do EDTA na atividade desoxirribonucleásica das frações F_{45-75} de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura	69
Figura 1.	Esquema de extração e obtenção da fração precipitada dos extratos brutos de raízes, caules, folhas e cotilédones de feijão-de-corda Pitiúba, com sulfato de amônio no intervalo de 45 a 75% de saturação (F_{45-75}) ...	34
Figura 2.	Plântulas de feijão-de-corda Pitiúba com cinco e sete dias após a semeadura em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M	47
Figura 3.	Comprimentos da raiz principal, da parte aérea e da plântula de feijão-de-corda Pitiúba com cinco e sete dias após a semeadura em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M	48
Figura 4.	Matérias frescas do sistema radicular, da parte aérea e da plântula de feijão-de-corda Pitiúba com cinco e sete dias após a semeadura em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M	49
Figura 5.	Matéria fresca dos cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba com cinco e sete dias após a semeadura em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M	51
Figura 6.	Teor de proteína de extratos de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba em função do tempo de semeadura em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M	52
Figura 7.	Atividade ribonucleásica específica e total em extratos de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba em função do tempo de semeadura em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M	53

- Figura 8.** Cromatografia em coluna de CM-Celulose da F_{45-75} de extratos de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada 55
- Figura 9.** Cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-25 da F_{CM} de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada 56
- Figura 10.** Cromatografia em coluna de Sephadex G-50 da F_{DEAE} de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada 57
- Figura 11.** Eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, da fração purificada da RNase (F_{G50}) de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada 60
- Figura 12.** Teste de ELISA para detecção de RNase nos extratos brutos de cotilédones de feijão-de-corda Pitiúba em função do tempo de semeadura em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M 61
- Figura 13.** Detecção de RNase pelo teste de ELISA, em extratos brutos de raízes, cotilédones, caules e folhas de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada 63
- Figura 14.** Reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em camundongos imunizados com a RNase cotiledonária purificada (F_{G50} extraída do gel de poliacrilamida) 64
- Figura 15.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de RNase nas F_{CM} de raízes, caules, folhas e cotilédones e na F_{G50} de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada 66
- Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose para detectar o efeito do tratamento térmico sobre o DNA (linear) 70
- Figura 17.** Atividade ribonucleásica das frações F_{CM} de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, em função do tempo de reação, com RNA na concentração final de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ 72

- Figura 18.** Eletroforese em gel de agarose para detecção de atividade desoxirribonucleásica das frações F_{CM} de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda, com cinco dias após a semeadura em água destilada, utilizando como substrato o DNA linear. 73
- Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose para detectar os efeitos do $MgCl_2$ e do EDTA sobre a atividade desoxirribonucleásica das F_{CM} de raízes, caules e folhas em dois tempos de reação: 1 e 3 h, sendo usado como substrato o DNA linear 74
- Figura 20.** Eletroforese em gel de agarose para detectar os efeitos do $MgCl_2$ e do EDTA sobre a atividade desoxirribonucleásica das F_{CM} e F_{G50} de cotilédones, no tempo de reação de 1 h, sendo usado como substrato o DNA linear 76
- Figura 21.** Eletroforese em gel de agarose para detectar os efeitos dos íons Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} sobre a atividade desoxirribonucleásica da fração F_{G50} de cotilédones, no tempo de reação de 1 h, usando-se o DNA linear como substrato 78
- Figura 22.** Eletroforese em gel de agarose para detectar o efeito de concentrações crescentes de RNA sobre a atividade desoxirribonucleásica da fração purificada da RNase cotiledonária (F_{G50}), nos tempos de reação de 30, 60, 90 e 120 min, sendo usado como substrato o DNA linear 79
- Figura 23.** Eletroforese em gel de agarose para detectar os efeitos do $MgCl_2$ e do EDTA sobre a atividade desoxirribonucleásica da enzima purificada de cotilédones (F_{G50}), em quatro tempos de reação: 1, 2, 4 e 18 h, sendo usado como substrato o DNA circular 81

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ΔA_{260}	Diferença de absorbância em 260 nm;
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
F ₄₅₋₇₅	Fração precipitada do extrato bruto com sulfato de amônio no intervalo de 45 a 75% de saturação;
F _{CM}	Fração ativa obtida da cromatografia em coluna de CM-Celulose da F ₄₅₋₇₅ ;
F _{DEAE}	Fração ativa obtida da cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-25 da F _{CM} ;
F _{G50}	Fração ativa obtida da cromatografia em coluna de Sephadex-G ₅₀ - da F _{DEAE} ;
RNA	Ácido ribonucléico;
RNase	Ribonuclease (enzima específica para RNA como substrato);
DNA	Ácido desoxirribonucléico;
DNase	Desoxirribonuclease (enzima específica para DNA como substrato);
Nuclease	Enzima que utiliza tanto RNA como DNA como substratos;
PCA	Anafilaxia cutânea passiva;
UA	Unidade de atividade, definida como sendo igual a um ΔA_{260} de 0,01;
UA x h ⁻¹ x mg ⁻¹ Prot	Atividade ribonucleásica específica;
UA x h ⁻¹ x Cot ⁻¹	Atividade ribonucleásica total

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

A salinidade é um problema grave que, de acordo com dados da FAO (2000), atinge cerca de 45 dos 230 milhões de hectares da área irrigada do globo terrestre, trazendo sérios prejuízos para a produção agrícola. Em nosso país, apesar da carência de estudos que visem a delimitação das áreas salinizadas, sabe-se que este problema existe, principalmente, no semi-árido nordestino, onde se estima que cerca de 20 a 25% da área irrigada já se encontrem salinizadas ou em vias de salinização (Goes, 1978; Gheyi, 2000). Levantamento feito pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nas áreas irrigadas sob sua jurisdição, mostrou que cerca de 20% apresentaram problemas de salinidade, sendo que 12% dessas áreas já foram desativadas devido a esse problema (Gheyi, 2000). É conveniente destacar, que com a implantação de novos projetos de irrigação na região nordeste, a maioria dos quais com manejos inadequados no uso da água e do solo, associados com a elevada demanda evaporativa do ar na região, a salinidade só tende a aumentar.

O efeito mais proeminente da salinidade nas plantas é a redução do seu crescimento, trazendo como consequência redução em sua produção. De acordo com Munns (2002), esta redução no crescimento deve-se aos efeitos osmóticos e tóxicos dos íons, causando distúrbios nutricionais e metabólicos. No entanto, as concentrações de sais capazes de afetarem o crescimento das plantas variam amplamente entre as espécies, e dependem do tipo de sal, do tempo de exposição e do estágio de desenvolvimento da planta (Shannon, 1992). Em geral, as espécies cultivadas são susceptíveis à salinidade, podendo,

no entanto, encontrar-se entre estas espécies as que são altamente tolerantes ou as que são muito sensíveis (Lauchli & Epstein, 1984; Shannon *et al.* 1994).

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), leguminosa muito cultivada na região nordeste do Brasil, representa um dos alimentos básicos para alimentação humana (Araújo & Watt, 1988; Sena & Biserra, 1991). Esta cultura, considerada moderadamente sensível à salinidade (Maas & Hoffman, 1977), é tradicionalmente cultivada em condições de sequeiro, embora recentemente seu cultivo em perímetros irrigados tenha aumentado. Portanto, dada a importância sócio-econômica desta cultura, é fundamental o desenvolvimento de novos cultivares de feijão-de-corda que sejam tolerantes à salinidade. Uma alternativa viável e promissora para isso, é a produção de plantas transgênicas tolerantes à salinidade via engenharia genética, como foi comprovado pelo sucesso na obtenção de plantas transgênicas que se mostraram halotolerantes (Frommer *et al.*, 1999; Sakamoto & Murata, 2001; Zhang & Blumwald, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Apse & Blumwald, 2002). Para conseguir este intento, no entanto, é fundamental a realização de estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares que permitam identificar as características mais relacionadas com a tolerância ao estresse salino e que possam ser utilizadas nos programas de melhoramento.

A ribonuclease (RNase) é uma enzima que desempenha importante papel no metabolismo, tendo em vista que o nível de RNA, um dos componentes do processo de síntese protéica, pode ser alterado pela mesma. Esta enzima apresenta variações em atividade que se manifestam em função de diversos fatores, dentre eles o estresse salino (Sheoran & Garg, 1978; Gomes-Filho *et al.*, 1983; Gomes-Filho & Sodek, 1988; Gomes-Filho *et al.*, 1996). Estudos sobre a mobilização do RNA nos órgãos de reserva das sementes, mostram que à medida que o processo de germinação e estabelecimento da

plântula ocorre, o conteúdo de RNA decresce e, simultaneamente, a atividade ribonucleásica aumenta (Bryant *et al.*, 1976; Gomes-Filho *et al.*, 1983). Em condições de estresse salino, estudos realizados em *Vigna unguiculata* (Gomes-Filho *et al.*, 1983), mostraram que a salinidade ao inibir a mobilização do RNA nos órgãos de reserva das sementes, também inibia ou retardava o aumento de atividade desta enzima. Entretanto, até hoje, os mecanismos responsáveis pelo aumento de atividade da RNase, ou os mecanismos capazes de explicar como a salinidade afeta este processo, não são conhecidos.

Estudos sobre as RNases de raízes, caules e folhas de *Vigna unguiculata* mostraram que as mesmas tinham propriedades cinéticas e físico-químicas semelhantes àquelas de cotilédones (Franco *et al.*, 2001). Os resultados observados, contudo, não permitiram concluir se essas enzimas são iguais às presentes nos cotilédones. Nesses estudos, os autores também procuraram esclarecer se estas enzimas eram de fato RNases, que são enzimas que utilizam apenas o RNA como substrato, ou nucleases, que são aquelas que utilizam tanto o DNA quanto o RNA como substratos, conforme classificação proposta por Wilson (1975 e 1982) para as enzimas que hidrolisam os ácidos nucleicos. Os resultados sugerem que as enzimas em estudo sejam RNases e não nucleases, embora a questão não possa ser considerada totalmente esclarecida. É possível, por exemplo, que haja uma pequena degradação do DNA e que esta não seja detectada pelas leituras de absorbância de seus produtos de hidrólise. Para que essa questão possa ser definitivamente resolvida, faz-se necessário a utilização de uma técnica mais sensível para detectar os produtos de hidrólise do DNA, tal como a eletroforese em gel de agarose seguida de coloração com brometo de etídeo (Sambrook *et al.* 1989).

1.2. Objetivos

O presente trabalho foi concebido para esclarecer o mecanismo de aumento de atividade da RNase cotiledonária de *Vigna unguiculata*, durante a germinação e estabelecimento da plântula. Especificamente, pretende-se determinar se a RNase pré-existe na semente quiescente numa forma inativa e é ativada durante os primeiros dias de germinação ou se a mesma é sintetizada *de novo*. Em decorrência, também, seria esclarecido o mecanismo pelo qual a salinidade reduz a atividade dessa enzima. Pretende-se, também, determinar se as RNases presentes nas outras partes da plântula de *Vigna unguiculata* são idênticas, do ponto de vista imunológico, àquela dos cotilédones. Finalmente, é também objetivo deste trabalho esclarecer se tais enzimas são de fato RNases ou nucleases e, em sendo nucleases, realizar um estudo cinético da ação de alguns efetores sobre a atividade desoxirribonucleásica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Feijão-de-Corda

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], também conhecido como feijão-fradinho, feijão-de-massar, feijão-de-praia e caupi, é uma dicotiledônea pertence à família Fabaceae, que por sua vez, segundo a classificação de Cronquist (1988), encontra-se na subclasse Rosidae, ordem Fabales. Essa família está representada por aproximadamente 482 gêneros e 12.000 espécies, de ampla distribuição geográfica (Barroso, 1984) e de grande valor econômico.

De acordo com Braga (1976) o feijão-de-corda é uma planta herbácea, glabra, volúvel, prostrada ou trepadeira. As folhas são glabras, trifoliadas, com os folíolos laterais assimétricos. Possui as flores grandes, brancas, amareladas ou lilases, de carena aguda, na extremidade de longos pedúnculos axilares. A vagem é cilíndrica, reta ou levemente curva, multisseminada e o grão é ovóide-rinóide, de casca ligeiramente rugosa, unicolor ou multicolor, segundo a forma agrícola.

O feijão-de-corda é muito difundido nas regiões norte e nordeste do Brasil, havendo hoje um consenso de que sua origem tenha ocorrido no sul da África (Singh *et al.*, 1997). No Brasil, ele foi introduzido no século XVII por colonizadores portugueses e espanhóis, junto com o comércio de escravos africanos (Freire-Filho, 1988). Constitui-se em um bom alimento, com cerca de 55% de carboidratos e 20 a 25% de proteína (Singh & Rachie, 1985; May *et al.*, 1988; Sales & Rodrigues, 1988), sendo também uma excelente forrageira, verde ou fenada (Braga, 1976).

2.2. Nucleases, RNases, DNases e Exonucleases

De acordo com Wilson (1975 e 1982), as enzimas que catalisam a hidrólise dos ácidos nucleicos são definidas ou denominadas de nucleases, que promovem a hidrólise tanto do RNA como do DNA, em pontos no interior da cadeia, ribonucleases (RNases), que são aquelas que utilizam apenas o RNA como substrato e são também endonucleases, desoxirribonucleases (DNases), que são as que utilizam apenas o DNA como substrato, sendo também endonucleases e exonucleases ou fosfodiesterases (PDases), que catalisam a hidrólise das ligações fosfodiésteres terminais de ambos os ácidos nucleicos. Além dessas enzimas, existem as 3'-nucleotidasas, que promovem a hidrólise do fosfato na posição 3' de um nucleotídeo. Ainda de acordo com este autor, as enzimas que degradam os ácidos nucleicos são classificadas em quatro tipos: nucleases I, RNase I, RNase II e exonucleases I.

Diversos trabalhos (Wilson, 1975 e 1982; Tvorus, 1976; Green, 1994) tratando sobre as propriedades das enzimas que hidrolisam o RNA em vegetais superiores mostram que, as nucleases I promovem a hidrólise tanto do RNA quanto do DNA, dando como produto final os 5'-nucleotídeos. Além disso, essas enzimas apresentam pHs ótimos de ensaio na faixa de 5,0 a 6,5, pesos moleculares de 31.000 a 39.000, têm alta sensibilidade ao EDTA e localizam-se em membranas ou organelas. As RNases I e II apresentam propriedades bastante semelhantes entre si e ambas promovem a hidrólise apenas do RNA, formando como intermediários os 2', 3'-nucleotídeos cíclicos. Por sua vez, as RNases do tipo I caracterizam-se por hidrolisarem apenas os nucleotídeos cíclicos derivados das bases purínicas (adenina e guanina), terem pHs ótimos de ensaio entre 5 e 6, pesos moleculares que variam de 20.000 a 25.000, apresentarem baixa sensibilidade ao EDTA e se localizarem, de modo geral, na parte solúvel dos extratos vegetais. Já as RNases do tipo II

hidrolisam os 2',3'-nucleotídeos cíclicos derivados de qualquer uma das bases purínicas ou pirimidínicas, têm pesos moleculares menores (17.000 a 21.000), pHs ótimos na faixa de 6 a 7, apresentam sensibilidade ao EDTA mais baixa que as do tipo I e localizam-se nos microsossomos. As exonucleases I, embora promovam as hidrólises do DNA e do RNA, dando como produtos os mesmos 5'-nucleotídeos que aqueles produzidos pelas nucleases I, possuem pesos moleculares mais elevados (superiores a 100.000), porém são também altamente sensíveis ao EDTA e sua localização intracelular é desconhecida. Entretanto, algumas enzimas que hidrolisam o RNA não se enquadram nesta classificação, algumas não puderam ser nela incluídas. Como exemplo, pode-se citar a RNase purificada de beterraba por Guerriero & Dunham (1979), que mostrou características distintas desta categoria, pois exibiu um peso molecular de 155.000, parecendo ser uma nuclease, porém não foi afetada pelo EDTA e mostrou-se altamente específica para RNA. Segundo Wilson (1982), algumas das discrepâncias com relação à classificação das RNases devem-se, em parte, ao fato das mesmas não terem sido testadas usando-se também como substrato o DNA. Portanto, é possível que algumas supostas RNases, na verdade sejam nucleases. Além disso, é possível que nas preparações protéicas, na realidade, existam misturas delas e não apenas uma determinada enzima. Em concordância com isso, vários trabalhos confirmaram, utilizando uma técnica onde a RNase é detectada no gel de poliacrilamida como uma banda descorada (Wilson, 1969), que a atividade ribonucleásica num extrato qualquer é resultante da presença de múltiplas formas desta enzima (isoenzimas). Tais trabalhos comprovam a existência de várias formas de RNases (isoenzimas) em sementes e órgãos de reserva (Wilson, 1971; Jacobsen, 1980; Gomes & Sodek, 1988) ou em outras partes das plantas (Gomes Filho & Enéas Filho, 1991; Sindelarova *et al.*, 2000). No entanto, até hoje não se conhece bem as propriedades destas múltiplas formas da RNase e nem suas funções biológicas específicas.

2.3. Salinidade

2.3.1. Conceito e aspectos gerais

Um solo é considerado salino quando contém sais solúveis em quantidades suficientes para prejudicar o crescimento das plantas ou, mais precisamente, como sugerido pela Sociedade Americana de Ciências do Solo, quando apresenta condutividade elétrica superior a $4 \text{ dS} \times \text{m}^{-1}$ (Richards, 1954), embora haja autores que estimem este valor em $2 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ (Bresler *et al.*, 1982). Os íons que comumente contribuem para a salinização dos solos incluem os ânions cloreto, sulfato, carbonato e bicarbonato, e os cátions sódio, cálcio e magnésio (Richards, 1954), podendo também ser encontrados os íons nitrato e potássio, porém, em menores concentrações (Mckersie & Leshem, 1994).

As causas de salinização dos solos são agrupadas em naturais (salinização primária) e artificiais (salinização secundária). A salinização primária deve-se a processos naturais, enquanto a salinização secundária deve-se às atividades antrópicas (Gheyi, 2000; Larcher, 2000). Segundo Poljakoff-Mayber & Lerner (1994), as causas naturais surgem devido às inundações dos solos por águas salgadas ou devido ao intemperismo químico ou às atividades vulcânicas. As causas artificiais resultam da má qualidade das águas utilizadas na irrigação, bem como da baixa eficiência dos sistemas de drenagem. No semi-árido nordestino, a salinização secundária, comum nos perímetros irrigados, reduz a produtividade das plantas cultivadas, trazendo problemas sociais, tais como abandono das terras e migração para os centros urbanos (Oliveira, 1997).

A salinidade é um dos principais processos de degradação dos solos, afetando 19,5% das terras irrigadas do planeta e 2,1% da área agricultável de sequeiro (FAO, 2000). É um problema mundial que se manifesta, principalmente, em regiões áridas e semi-áridas,

delimitadas pelas latitudes de 30° N a 30° S, onde a evaporação é maior que a precipitação (Gheyi, 2000; Larcher, 2000). O nordeste brasileiro, por ser uma região semi-árida e apresentar alta demanda evaporativa do ar associada a um deficiente sistema de drenagem, depara-se com o problema de salinidade que atinge de 20 a 25% de suas terras irrigadas (Goes, 1978). Embora não existam levantamentos detalhados e precisos do problema de salinidade nos diversos perímetros irrigados do nordeste, em média, 12% da superfície agrícola útil foram desativados e 7,6% estão salinizados, sendo que nos perímetros irrigados de Sumé, São Gonçalo, Vaza-Barris e Jacurici, a percentagem de área salinizada é superior a 20%. No Ceará, os mais elevados percentuais de área salinizada são encontrados em Forquilha e Várzea do Boi, alcançando um valor superior a 9% (Gheyi, 2000).

Por ser um problema grave e que pode comprometer o futuro da agricultura em muitas áreas de nosso planeta (Ashraf, 1994), a salinidade tem sido extensivamente estudada. De acordo com Prisco (1987), são quatro as opções para resolver o problema da salinidade ou de solos em vias de salinização: 1. recuperação dos solos salinizados; 2. desenvolvimento de plantas melhoradas geneticamente, no sentido de aumentar a resistência à salinidade; 3. desenvolvimento de pesquisas para “domesticação de halófitas” com potencial econômico e 4. desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de melhorar o manejo de glicófitas cultivadas em solos salinos. A primeira opção, por envolver grandes investimentos, somente em determinadas circunstâncias poderá ser economicamente viável (Strogonov, 1964). Em relação às demais opções, os resultados parecem ser promissores, principalmente levando-se em conta o grande número de pesquisadores atualmente trabalhando nesta área. Nota-se, no entanto, que as pesquisas desenvolvidas no sentido de minorar os efeitos da salinidade ou de induzir resistência aos cultivares, não têm

apresentado melhores resultados por falta de um conhecimento mais aprofundado sobre a fisiologia e bioquímica das plantas sob condições salinas.

2.3.2. Efeitos no metabolismo vegetal

As concentrações de sais que restringem o crescimento das plantas variam amplamente entre as espécies e, dependem do tipo de sal, do tempo de exposição e do estágio de desenvolvimento da planta (Shannon, 1992). A germinação e o crescimento de glicófitas, por exemplo, podem ser inibidos por baixas concentrações de sal (0,5 e 0,3%, respectivamente), enquanto que as halófitas podem germinar em salinidades 10 vezes maiores e, também, crescer e se desenvolver em solos contendo até 20% de sal (Levitt, 1980). Ainda de acordo com esse autor, o estresse salino pode provocar dois tipos de injúrias: primária e secundária. A injúria primária corresponde ao efeito tóxico específico do sal diretamente na membrana plasmática ou no protoplasma. A injúria secundária, por sua vez, deve-se a um estresse osmótico secundário, chamado de seca fisiológica (Schimper, 1898, citado por Prisco, 1980), que se manifesta quando o gradiente de potencial hídrico no sistema solo-planta é diminuído, em função do aumento na concentração de sais. Ela também pode ser consequência de uma desordem nutricional, resultado do efeito da salinidade sobre a disponibilidade, absorção competitiva, transporte e partição dos nutrientes dentro da planta, ou pode ser provocada pela inativação fisiológica de um dado nutriente, elevando o requerimento interno da planta por esse elemento nutricional (Grattan & Grieve, 1999). Em decorrência dessas injúrias, os principais efeitos da salinidade são as modificações no balanço hormonal e na expressão gênica, a redução na absorção de água, as alterações nas concentrações de solutos inorgânicos e orgânicos, as alterações físicas nas estruturas de membranas e paredes

celulares e a diminuição da fotossíntese, acarretando diminuição na produção (McKersie & Leshem, 1994; Amzallag & Lerner, 1995; Zhu *et al.*, 1997; Bohnert & Sheveleva, 1998).

As halófitas desenvolveram, basicamente, dois mecanismos adaptativos aos altos níveis de sais em seus ambientes. Um mecanismo consiste em impedir que os sais entrem na planta ou que sejam impedidos de serem transportados, via xilema, da raiz para as folhas e o outro, consiste no sequestro no vacúolo da maioria dos sais que chegam às folhas (O'Leary, 1995). Neste último, a entrada e o transporte dos íons para as folhas não são impedidos nem severamente restringidos, e o problema é tratado primariamente a nível de tonoplasto das células foliares (Barkla & Pantoja, 1996). No caso do íon sódio, seu transporte para o interior do vacúolo é realizado pelo sistema antiporte Na^+/H^+ , utilizando para isso um gradiente eletroquímico de prótons gerado por bombas H^+ -ATPase do tipo V (V-ATPase) e pirofosfatases vacuolares (V-PP_iase) (Tyerman & Skerrett, 1999; Blumwald, 2000). O papel do sistema antiporte Na^+/H^+ para a tolerância ao sal foi demonstrado em plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênica superexpressando o gene AtNHX1, que codifica uma proteína vacuolar responsável pelo sistema antiporte Na^+/H^+ (Apse *et al.*, 1999; Fromer *et al.*, 1999). O objetivo final desses mecanismos de tolerância é manter uma concentração citosólica de sódio relativamente baixa e uma alta relação K^+/Na^+ (Niu *et al.*, 1995).

Alterações no metabolismo de plantas sob estresse salino também são refletidas pelos tipos de solutos orgânicos produzidos, sendo que as concentrações de alguns destes solutos podem aumentar em cerca de 100 vezes (Taiz & Zeiger, 2002). Isso contribui para o ajustamento osmótico, considerado um importante mecanismo para a tolerância ao estresse (Serraj & Sinclair, 2002). As plantas podem se ajustar osmoticamente ao estresse salino por intermédio do acúmulo de sais, principalmente nos vacúolos, e do acúmulo de solutos orgânicos no citoplasma, tais como os álcoois (glicerol, manitol e sorbitol), os

açúcares não-redutores (sacarose e trealose), alguns aminoácidos (ácido glutâmico e prolina), os sais de amônio quaternário (betaínas) e os sais sulfônicos terciários (3-dimetilsulfoniopropionato) (Rodhes & Hanson, 1993; Serrano, 1996; Trossat *et al.*, 1998). Tais solutos orgânicos, ditos compatíveis, contribuem também para a estabilidade das proteínas, complexos protéicos e membranas celulares de plantas sob condições de estresse, além de funcionarem como neutralizadores de radicais livres de oxigênio (Greenway & Munns, 1980; Yancey *et al.*, 1982; Bohnert & Shen, 1999). Os solutos compatíveis exercem seu efeito protetor ou estabilizante sobre a estrutura e a função das proteínas por não se incluírem na camada de hidratação destas. Neste caso, eles não perturbam as interações proteína-proteína, como acontece com os íons (Bohnert & Shen, 1999).

2.3.3. Efeitos na atividade enzimática

Os efeitos da salinidade na atividade enzimática podem ser decorrentes, pelo menos em parte, da alteração da síntese ou da inibição e/ou ativação de enzimas pré-existentes. Estudos sobre a fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas superiores, voltados para a análise dos efeitos da salinidade na atividade enzimática, têm produzido resultados variados. Alguns pesquisadores, por exemplo, observaram aumentos em atividade (Gopal & Rao, 1982), enquanto outros observaram diminuições (Porath & Poljakoff-Mayber, 1968; Sheoran & Garg, 1978; Prisco *et al.*, 1981; Gomes Filho *et al.*, 1983; Gomes Filho & Sodek, 1988) e há outros, ainda, que não observaram alterações (Greenway & Osmond, 1972; Sheoran & Garg, 1978). Por outro lado, análises proteômicas têm revelado alterações profundas nos tipos e nas concentrações de proteínas de plantas sob estresses hídrico e salino, muitas delas com atividade enzimática (Salekdeh *et al.*, 2002a e 2002b).

As RNases são conhecidas por apresentarem grandes variações em atividade que se manifestam em função da própria ontogenia da planta (Kessler & Engelberg, 1962; Hsiao, 1968) ou pela ação de diversos fatores tais como: injúria mecânica (Sacher *et al.*, 1975; Isola & Franzoni, 1986), processo infecciosos (Chakravorty *et al.*, 1974) e condições de estresse hídrico e salino (Vieira da Silva, 1970; Sheoran & Garg, 1978; Gomes Filho *et al.*, 1983; Gomes-Filho *et al.*, 1996). Essas enzimas desempenham importante papel no metabolismo tendo em vista que o nível de RNA, um dos componentes do processo de síntese protéica, pode ser por ela regulado. É aceito, de modo geral, que a função desta enzima seja a de promover a hidrólise do RNA, produzindo nucleotídeos que são empregados na síntese de novos RNAs (Tvorus, 1976). Em condições de estresse salino, estudos em *Vigna unguiculata* mostraram que esta enzima tem sua atividade inibida ou retardada nos cotilédones durante a germinação e estabelecimento da plântula (Gomes-Filho *et al.*, 1983).

Alguns trabalhos foram feitos no sentido de esclarecer a natureza do aumento da atividade da RNase nos órgãos de reserva durante a germinação e estabelecimento da plântula, ou seja, se o mesmo é devido a uma síntese *de novo* da enzima e/ou sua ativação. Os resultados são controversos tendo autores observados ser o aumento da atividade da RNase dependente da síntese *de novo* (Bennett & Chrispeels, 1972, em *Hordeum vulgare*), parcialmente dependente (Bryant *et al.*, 1976) ou independente (Barker *et al.*, 1974, em *Pisum arvense*).

2.3.4. Efeitos na expressão gênica

O processo de síntese protéica é bastante afetado por estresses ambientais, tais como: choques térmico e osmótico, estresses hídrico e salino, injúrias e baixas

temperaturas (Hurkman & Tanaka, 1987; Sabehat *et al.*, 1998). Em plantas superiores, o estresse osmótico induz a expressão de genes específicos, conhecidos como genes *OSR-osmotic stress regulated-* (Serrano & Gaxiola, 1994; Niu *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1997; Moons *et al.*, 1995), ao mesmo tempo em que há diminuição na expressão de outros (Liu & Zhu, 1997). Alguns dos produtos desses genes, provavelmente, desintoxicam as plantas pela remoção das espécies de oxigênio reativo ou as previne dos danos causados às suas estruturas celulares. Em relação ao estresse salino, foi observado em uma variedade de arroz halotolerante, que alguns peptídeos tiveram sua síntese induzida, enquanto outros tiveram suas sínteses reprimidas (Ramani & Apte, 1997). Em cevada, o estudo da expressão gênica em genótipos sensíveis e tolerantes à salinidade mostrou que os mRNAs funcionais em plantas de ambos os genótipos eram praticamente os mesmos, porém, sob condições de salinidade, tal situação não ocorreu, havendo uma transcrição diferencial de alguns genes (Ramagopal, 1987). Portanto, os resultados sobre os efeitos do estresse osmótico e/ou salino na síntese protéica, da mesma forma que aqueles na atividade enzimática, são variáveis, o que dificulta fortemente o entendimento de como o estresse osmótico ou salino afeta o metabolismo vegetal. Apesar disso, a maioria dos melhoramentos genéticos em plantas tolerantes ao sal têm sido realizados pela estratégia de desintoxicação. Isso é evidente nos casos de plantas transgênicas que superexpressam enzimas envolvidas na proteção oxidativa (Zhu, 2001).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

No presente trabalho foram utilizadas sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivar Pitiúba, provenientes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará. As sementes, após seleção, foram mantidas em vidros selados contendo sílica gel, à temperatura de aproximadamente 8°C, até sua utilização.

3.2. Animais

Como animais de experimentação, foram utilizados camundongos “swiss”, fêmeas, com dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Esses animais foram mantidos em colônia fechada, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, durante todas as etapas envolvidas na realização dos experimentos.

3.3. Condições de Germinação

As sementes de feijão-de-corda, após tratamento de desinfecção com uma solução de hipoclorito de sódio, contendo 2,0% de cloro ativo, por 10 min, foram postas para germinar em papel de filtro devidamente esterilizado por autoclavagem à 121°C, por 20 min, segundo Prisco & O'Leary (1970). Após lavagem exaustiva com água destilada, as sementes foram semeadas em papel de filtro umedecido com água desionizada (tratamento controle) ou com solução de NaCl 0,1 M (tratamento salino), entre duas folhas de papel de

controle) ou com solução de NaCl 0,1 M (tratamento salino), entre duas folhas de papel de filtro, a cerca de 2,0 cm da borda superior. Foram dispostas dez sementes em única fileira. Em seguida, cinco conjuntos de duas folhas de papel, contendo as sementes, foram enrolados individualmente e dispostos verticalmente em recipientes de plásticos (8 cm x 8 cm x 13 cm), contendo 25 mL de água desionizada ou solução de NaCl 0,1 M. Quatro desses recipientes foram, em seguida, colocados em cubas de acrílico (24 cm x 24 cm x 50 cm), as quais foram deixadas na obscuridade, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa em seu interior de aproximadamente 100%.

3.4. Medidas de Crescimento

As medidas de crescimento foram efetuadas em plântulas com cinco e sete dias após a semeadura em condições controle e de estresse salino. As plântulas foram divididas em raiz e parte aérea, sendo efetuadas medidas de comprimento da raiz principal, da parte aérea e da plântula, bem como as das matérias frescas dos cotilédones, sistema radicular, parte aérea e da plântula. Foram feitas três repetições, cada uma correspondendo a um grupo de 10 plântulas.

3.5. Extração e Precipitação com Sulfato de Amônio

Para preparação dos extratos, foram coletadas plântulas com 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a semeadura em água desionizada (controle) ou em solução de NaCl 0,1 M (tratamento salino), as quais foram separadas em cotilédones, raízes, caules e folhas. Esse material foi mantido à temperatura de -20°C , até sua posterior utilização.

O extrato bruto foi preparado de acordo com Gomes-Filho & Enéas-Filho (1991), sendo os diversos tecidos macerados em almofariz, com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 5,7 na proporção de 1:5 (p/v), por cerca de 1 h, a 4°C. A suspensão foi filtrada em tela de nylon e o homogenato centrifugado a $9.000 \times g$, por 20 min, a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (extrato bruto) dialisado contra água destilada por 24 h, à 8°C.

Ao extrato bruto, adicionou-se sulfato de amônio em quantidade suficiente para atingir 45% de saturação. A mistura foi deixada em repouso por aproximadamente 1 h em banho de gelo. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a $9.000 \times g$ por 20 min, a 4°C, sendo o precipitado desprezado. Ao sobrenadante, adicionou-se sulfato de amônio em quantidade suficiente para atingir 75% de saturação, sendo a mistura deixada em repouso por cerca de 1 h, em banho de gelo. Em seguida, esse homogenato foi centrifugado a $9.000 \times g$ por 20 min, a 4°C, tendo-se desprezado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0, dialisado contra o mesmo tampão por 24 h, à 8°C e, em seguida, centrifugado nas condições descritas anteriormente, sendo o precipitado descartado. Posteriormente, este último sobrenadante, foi dialisado contra água destilada por 24 h, à 8°C, centrifugado e liofilizado (fração F₄₅₋₇₅). As etapas de extração e obtenção desta fração estão descritas no esquema da Figura 1.

3.6. Determinação de Proteína

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), com pequenas modificações, adicionando-se 2,5 mL do reagente do coomassie brilliant blue G-250 (Sigma) a 0,05 mL da amostra (extrato bruto e fração F₄₅₋₇₅), sendo em seguida feitas leituras de absorbância em 595 nm. Em amostras com baixa concentração de

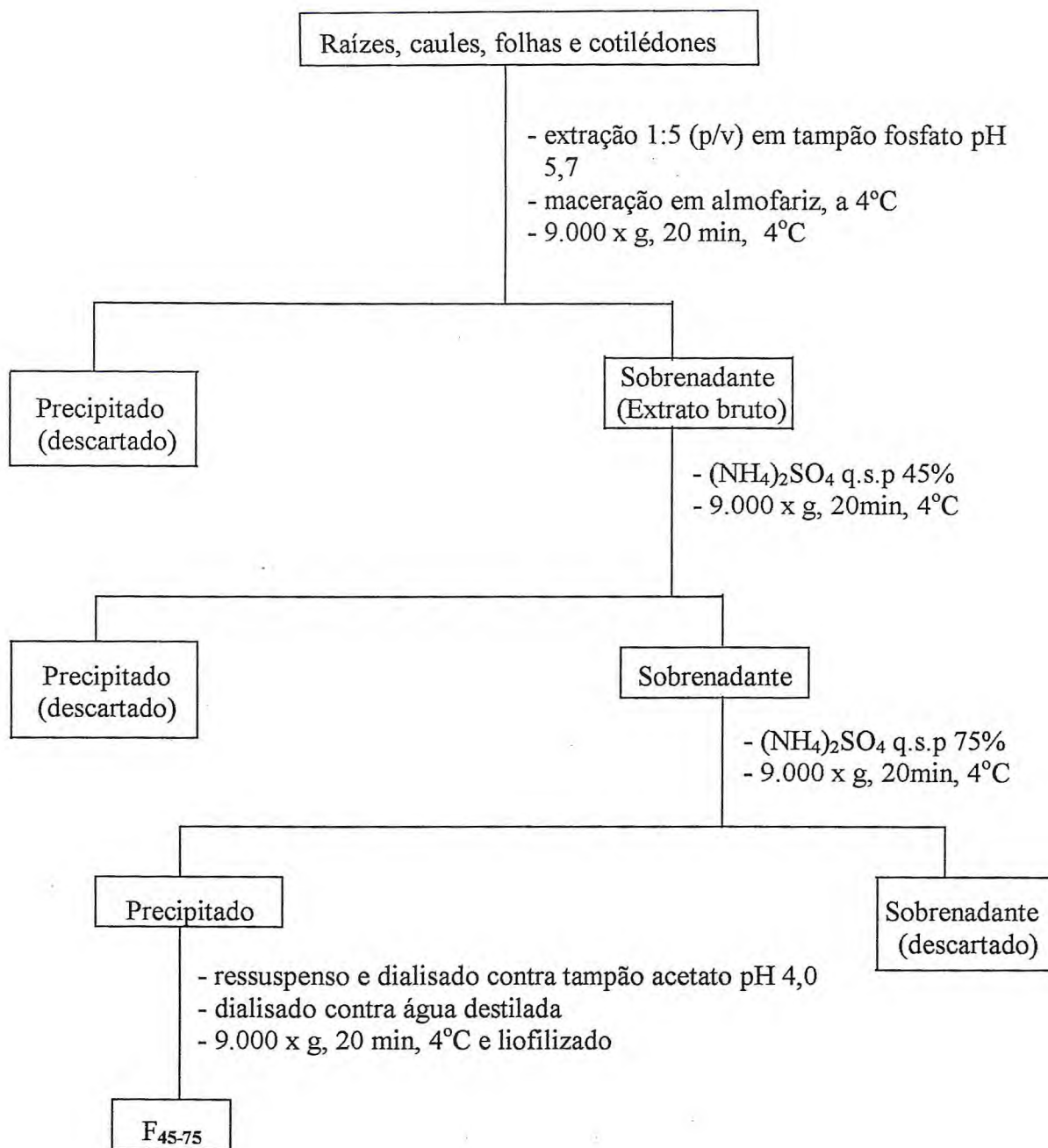


Figura 1. Esquema de extração e obtenção da fração precipitada dos extratos brutos de raízes, caules, folhas e cotilédones de feijão-de-corda Pitiúba, com sulfato de amônio no intervalo de 45 a 75% de saturação (F₄₅₋₇₅).

de proteína (frações mais purificadas da enzima), para aumentar a sensibilidade do método, foi usado apenas 1,0 mL do reagente do coomassie. A albumina sérica bovina cristalizada e liofilizada (Sigma) foi usada como padrão. O teor de proteína nos cotilédones durante a germinação foi expressa em $\text{mg}\cdot\text{cot}^{-1}$, e os valores apresentados representam médias de três extratos, cada um dosado em triplicata.

3.7. Purificação da Enzima

3.7.1. Cromatografia em CM-Celulose

As frações F_{45-75} de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda com cinco dias após a semeadura em água destilada, foram purificadas através de cromatografia de troca iônica, em coluna de CM-Celulose (Gomes Filho *et al*, 1994). A coluna, de dimensões 1,8 cm x 17,5 cm, foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0. O fluxo da coluna foi ajustado para $32 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, sendo coletadas frações de 4,8 mL. As cromatografias se processaram a uma temperatura de 10°C e, em cada uma, foram aplicados 30 mg do pó liofilizado da F_{45-75} dissolvidos em tampão acetato 0,1 M, pH 4,0. A amostra foi eluída da coluna com este mesmo tampão e o material retido na coluna foi eluído com um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M (preparado no tampão de eluição), num volume total de 100 mL. Após determinações da atividade ribonucleásica nas frações, aquelas com maiores valores foram combinadas e dialisadas contra água destilada por 24 h, a 8°C . Posteriormente, em situações que serão especificadas, este material (F_{CM}) foi liofilizado parcialmente e armazenado a -20°C , ou foi completamente liofilizado, sendo posteriormente transformado em pó e armazenado a 10°C .

3.7.2. Cromatografia em DEAE-Sephadex A-25

A fração (F_{CM}) de cotilédones foi posteriormente purificada através de cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-25, de acordo com Gomes-Filho *et al.* (1999), de dimensões 1,1 cm x 24 cm e equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,2. O fluxo da coluna foi ajustado para 32 mL x h⁻¹ e a cromatografia realizada a aproximadamente 10°C, sendo coletadas frações de 3,0 mL. Em geral, foram aplicados em cada cromatografia 6,0 mg da fração F_{CM} dissolvidos em 1,0 mL de tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,2. A eluição foi iniciada com este tampão e, em seguida, com um gradiente de 0 a 0,4 M de NaCl, num volume total de 80 mL. As frações com maiores atividades (resultantes de três cromatografias) foram reunidas, e o material resultante foi dialisado contra água destilada por 24 h, a 8°C. Em seguida, essa amostra foi concentrada por liofilização para um volume final de aproximadamente 2,0 mL (F_{DEAE}). Essa fração foi mantida à temperatura de - 20°C, até sua posterior purificação.

3.7.3. Cromatografia em Sephadex G-50

A fração F_{DEAE} foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular, usando-se uma coluna de Sephadex G-50 (1,5 cm x 46,0 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,8 (Gomes-Filho *et al.*, 1999). O fluxo da coluna, bem como as condições de temperatura, foram as mesmas empregadas nas cromatografias anteriores, sendo coletadas frações de 3,8 mL. As amostras foram preparadas adicionando-se a 2,0 mL da F_{DEAE} , 2,0 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,8, sendo o volume resultante aplicado à coluna. As frações com maiores atividades foram reunidas e a amostra

resultante dialisada contra água destilada por 24 h, a 8°C e concentrada por liofilização (F_{G50}). Essa fração foi mantida à - 20 °C, até sua posterior utilização.

3.8. Atividade Ribonucleásica

3.8.1. Por medidas de absorbância em 260 nm

A atividade ribonucleásica foi determinada segundo método de Tuve & Anfinsen (1960), com algumas modificações. Nos experimentos em que se testou o efeito da salinidade na atividade enzimática (extrato bruto liofilizado, proveniente de cotilédones de plântulas com 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a semeadura), bem como naqueles para determinação das atividades das frações purificadas das várias partes da plântula (raízes, caules, folhas e cotilédones), a reação foi desencadeada pela adição do substrato (RNA na concentração final de 2 mg.mL⁻¹, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,8) à enzima (extrato bruto ou frações purificadas), à temperatura de 40°C, em um volume final de 2,5 mL, sendo retiradas alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação nos tempos de 5, 35 e 65 min. Essas alíquotas foram colocadas em tubos Eppendorf, contendo 0,1 mL de acetato de uranila a 0,75% em ácido perclórico a 25%, com o propósito de interromper a reação enzimática por precipitação do substrato. Após repouso em banho de gelo, por no mínimo 20 min, a mistura foi centrifugada a 12.000 x g, por 5 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi diluído com água destilada (1:25) e teve sua absorbância determinada em 260 nm (A₂₆₀). Definiu-se uma unidade de atividade (UA) como sendo igual ao acréscimo de A₂₆₀ de 0,01, sendo a atividade específica expressa em UA.h⁻¹.mg⁻¹ Prot e a total em UA.h⁻¹.Cot⁻¹. A atividade ribonucleásica também foi expressa como ΔA₂₆₀.

Nos ensaios onde se testou a atividade enzimática das amostras utilizando-se DNA e RNA como substratos, o volume final de reação foi reduzido para 300 μL , sendo, contudo, mantida a mesma concentração final de RNA ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e as demais condições de ensaio descritas anteriormente. Neste caso, a reação enzimática foi parada com acetato de uranila em dois tempos: um aos 5 min e outro em tempos que variaram em até 5 h.

Em alguns ensaios, que serão devidamente especificados, a atividade ribonucleásica foi analisada com RNA na concentração final de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$, num volume final de reação de 50 μL , sendo mantidas as demais condições de ensaio.

Os ensaios de atividade ribonucleásica foram feitos com, no mínimo, três repetições.

3.8.2. Por eletroforese para detecção de isoenzimas de RNase

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em condições não desnaturantes, segundo Davis (1964), e modificada por Wilson (1978) e Gomes Filho & Sodek (1988). A placa de gel de poliacrilamida tinha as dimensões de 10,5 cm x 8,0 cm x 0,1 cm. O gel de separação foi usado na concentração de 12% em acrilamida e o de aplicação da amostra a 3,75%. As amostras (F_{CM} das diversas partes da plântula) para aplicação nos géis foram preparadas em tampão tris-HCl a 62,5 mM, pH 6,8, contendo sacarose a 10% e azul de bromofenol a 0,005%. Como tampão de corrida foi usado tris a 0,01 M, glicina a 0,076 M, pH 8,3, sendo a corrida desenvolvida a 15 mA, à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 h. Para revelação das isoenzimas de RNase, o gel foi primeiramente pré-incubado com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,8 por 10 min à

temperatura ambiente. Em seguida, foi incubado por 20 min com RNA a 0,1%, à temperatura de 40°C, pós-incubado por 2 a 3 min com o tampão de pré-incubação e corado por 1 min com uma solução de azul de toluidina a 0,2% em ácido acético a 0,5%, pH 3,0. Após o excesso de corante ser retirado com água destilada, o gel foi descorado com ácido acético a 0,5%. Decorridos cerca de 30 min de descoramento, começaram a aparecer no gel regiões descoradas, supostamente nos locais onde se encontravam as isoenzimas de RNase, que por hidrolizarem o RNA, impedem a formação do complexo (de cor azul) deste com o azul de toluidina. Após completa identificação dessas bandas, o gel foi deixado numa solução de ácido perclórico 5%, que muda a cor do gel para lilás e evita que as mesmas se alarguem demasiadamente.

3.9. Atividade Desoxirribonucleásica

3.9.1. Por medidas de absorbância em 260 nm

A capacidade de hidrolisar o DNA das frações F_{45-75} e F_{CM} de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda, com cinco dias após a semeadura em água destilada, foi inicialmente analisada pelas leituras de absorbância em 260 nm dos produtos de hidrólise. A atividade desoxirribonucleásica foi determinada em condições idênticas àquelas do ensaio para a atividade ribonucleásica, segundo Sambrook *et al.* (1989), com modificações. Como substrato, foi usado um DNA linear (*DNA Salmon Testes*, Sigma) previamente desnaturado por aquecimento a 100°C, por 3 min, seguido de rápido resfriamento em banho de gelo. A reação enzimática foi desencadeada pela adição de DNA na concentração final de $0,5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ à enzima (F_{45-75} e F_{CM}), em tampão acetato de

sódio 0,1 M, pH 5,8, à temperatura de 40°C, sendo o volume final da reação de 300 µL. Aliquotas de 70 µL da mistura de reação foram retiradas nos mesmos tempos especificados anteriormente para os ensaios de atividade ribonucleásica num volume de 300 µL. Tais alíquotas foram colocadas em tubos Eppendorf contendo 20 µL de acetato de uranila 0,75% em HClO₄ a 25% para parar a reação. As etapas seguintes, até as leituras em 260 nm, foram idênticas àquelas para o ensaio de atividade ribonucleásica. Os ensaios de atividades desoxirribonucleásicas foram feitos sempre em amostras com elevadas atividades ribonucleásicas e os valores representam médias de experimentos feitos, no mínimo, em duplicatas.

3.9.2. Por eletroforese para detecção de DNA

Para a determinação de atividade desoxirribonucleásica por eletroforese horizontal, os ensaios de atividade enzimática foram feitos usando-se um DNA linear (λ -DNA, MBI Fermentas) e um circular (plasmídeo recombinante, pZL1 [AOX], 5.508 pb). A reação enzimática se processou pela adição das amostras (F_{CM} e F_{G50}) ao DNA na concentração final de 0,05 µg.µL⁻¹, sendo o volume de reação completado para 50 µL com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,8. A mistura de reação foi incubada a 40°C, por tempos variados e, em seguida, foram deixadas em banho de gelo (ou mantidas no freezer a -20°C) até serem utilizadas nas eletroforeses.

A eletroforese horizontal em gel de agarose foi feita segundo Sambrook *et al.* (1989), com pequenas modificações. O gel de agarose, com dimensões de 10,5 cm x 7,8 cm x 0,7 cm, foi preparado na concentração de 0,9% no tampão tris-borato 0,045 M, contendo EDTA a 1 mM (TBE). As eletroforeses foram feitas na cuba GNA 100 da

Pharmacia Biotech, sendo empregado como tampão de corrida o TBE. Para aplicação nos poços, as amostras foram diluídas 1:2 com água esterilizada e, a um volume de 16 μL da amostra, foram adicionados 3,2 μL de tampão fosfato a 0,25 M, pH 6,8, contendo ficol a 15% (p/v) e azul de bromofenol a 0,005%, sendo em seguida, após completa homogeneização, aplicadas nos poços do gel de agarose. A corrida eletroforética desenvolveu-se a uma corrente constante de 50 mA, à temperatura de aproximadamente 25°C, por cerca de 1 h. Após a corrida, os géis foram imersos numa solução de brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, sob agitação constante, por 10 min. Em seguida, o gel foi deixado em água destilada por 10 min, em agitação, para retirada do excesso de brometo de etídeo. A identificação do DNA (ou de seus produtos de hidrólise) no gel foi feita pela emissão de fluorescência do brometo de etídeo ligado ao DNA (ou a seus produtos de hidrólise), quando excitado por luz ultravioleta (UV). A análise dos géis foi feita num transiluminador, com uma máquina fotográfica acoplada ao sistema, um monitor e um microcomputador, no qual foram gravadas as imagens dos géis em disquetes de 3,5".

3.9.3. Efeito dos efetores: EDTA, MgCl_2 , Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} na atividade desoxirribonucleásica

As atividades desoxirribonucleásicas das frações F_{CM} de raízes, caules, folhas e cotilédones e a F_{G50} de cotilédones foram estudadas incubando-se os efetores na mistura de reação na concentração final de 3 mM, por tempos variados. Em seguida, a mistura de reação foi deixada em banho de gelo ou mantidas à -20°C até serem utilizadas nas eletroforeses para detecção de DNA.

3.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de sódiuodecilsulfato (SDS) foi feita segundo método desenvolvido por Laemmli (1970). As dimensões da placa, bem como as concentrações de acrilamida e bis-acrilamida foram as mesmas descritas para a eletroforese em condições não desnaturantes (item 3.8.2). O tampão de corrida foi, também, o mesmo empregado naquela eletroforese, porém contendo SDS a 0,1%. Às amostras (F_{G50}), foram adicionados SDS e 2-mercaptoetanol (ME), respectivamente, para resultarem nas concentrações de 2 e 10%, quando então estas foram aquecidas por 3 min a 100°C. Após adição de sacarose e azul de bromofenol, nas concentrações anteriormente descritas, as amostras (alíquotas de 10 a 30 μ L) foram submetidas à eletroforese numa corrente constante de 15 mA. Após a corrida, os géis foram corados com o coomassie brilliant blue R 250 (Sigma), preparado a 0,04% numa solução aquosa contendo metanol a 4% e ácido acético a 7%. Após cerca de 3 h de coramento, os géis foram descorados com uma solução aquosa de metanol a 30% e ácido acético a 7%.

3.11. Imunização dos Camundongos

A amostra para imunização dos camundongos (F_{G50}), foi primeiramente submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS. Para cada eletroforese foram aplicados 10 μ g de proteína, sendo a banda correspondente à enzima purificada, após identificação por coramento do gel com o coomassie, extraída e macerada com 0,5 mL de uma solução aquosa estéril de NaCl a 0,15 M. A esta mistura, adicionou-se igual volume

do adjuvante completo de Freud, sendo a emulsificação feita manualmente com o auxílio de uma seringa. A emulsão foi considerada adequada para inoculação nos animais quando ao ser gotejada em água, não perdia a sua forma original.

Para cada imunização, foi usado um grupo de cinco camundongos, sendo cada animal inoculado com 200 μ L da amostra emulsificada, por via subcutânea, na região dorsal. Os animais receberam reforços aos 28 e 42 dias após o início da imunização, nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.11.1. Obtenção dos Antissoros

Os animais foram sangrados aos 14, 28, 35, 42 e 48 dias após o início da imunização, sendo o sangue coletado com pipeta Pasteur, por punção do plexo retro-orbital. O sangue foi deixado em repouso durante 1 h à temperatura de 25°C, para retração do coágulo. Em seguida, o mesmo foi centrifugado a 2.000 x g, por 5 min, para obtenção de um soro límpido, livre de hemácias (antissoro). Os antissoros foram então distribuídos em tubos eppendorff, devidamente etiquetados e armazenados a -20°C até o momento de suas utilizações. Antes da primeira inoculação dos animais com o antígeno, foi feita uma sangria para obtenção do soro pré-imune.

3.12. Ensaio de Elisa (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Os antissoros obtidos foram utilizados em ensaios de ELISA indireto, segundo Verdolin (2001), para quantificação ou identificação da presença de anticorpos produzidos contra a enzima (RNase). Como antígeno, foi usada a RNase purificada a partir de extratos

protéicos de raízes, caules e folhas de plântulas, com cinco dias após a semeadura em condições controle, e de cotilédones de sementes quiescentes e provenientes de plântulas com 1, 3, 5 e 7 dias em condições controle e de estresse salino. Para esses ensaios, as placas de ELISA (U96-Polysorp-Nunc-Immuno Plate Batch 016181) foram sensibilizadas com o material liofilizado dos extratos brutos (antígenos) dissolvidos em NaCl 0,15 M, de modo a resultarem numa concentração final em proteína de $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, sendo aplicados 100 μl em cada poço. As placas foram incubadas a 4°C , por 18 h, para a fixação do antígeno às mesmas. Em seguida, as placas foram lavadas por três vezes com o tampão de PBS (40 g de NaCl + 1 g de KCl + 1 g de KH_2PO_4 + 5,75 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no volume de 500 mL), contendo Tween-20 a 0,05%, e bloqueadas com tampão PBS, contendo leite mólico a 5%. Para isso, as placas foram envolvidas em papel de alumínio e incubadas a 37°C , por 1 h, e posteriormente lavadas por três vezes com a solução de PBS, contendo Tween-20 a 0,05 %. As placas foram então incubadas com o antissoro diluído 1:5 em NaCl 0,15 M, a 37°C , durante 2 h, sendo, em seguida, feita nova série de lavagens, como descrito anteriormente. O conjugado formado por imunoglobulinas, ligadas à peroxidase [Anti-mouse Polyvalent Immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) Peroxidase Conjugate, da Sigma], foi adicionado às placas na diluição de 1:1000 com tampão PBS, contendo leite mólico a 5%. Após um período de incubação de 1 h a 37°C , seguiu-se uma nova série de lavagens das placas com PBS-Tween. A reação foi desenvolvida por adição do cromóforo O-phenylenediamine (Sigma), deixando-se as placas envolvidas com papel alumínio a 25°C , por 30 min. A reação teve sua intensidade avaliada através de medidas de absorbância em 492 nm (A_{492}), realizadas em um micro Elisa Labystems Multiskan MS. Como controle, foi usado o soro sem os anticorpos específicos, e os valores de A_{492} obtidos, subtraídos daqueles correspondentes à reação com os soros imunes, sendo os

resultados expressos como ΔA_{492} . Os valores dos testes de ELISA representam médias de, no mínimo, três experimentos.

3.13. Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva

Os antissoros descritos anteriormente foram testados através de anafilaxia cutânea passiva (PCA), segundo metodologia descrita por Ovary (1952) e modificada por Mota & Wong (1969). Para isso, a pele da região dorsal dos camundongos foi depilada, sob leve anestesia com éter, sendo injetados por via intradérmica em quatro pontos previamente marcados, os quais serviram de repetições, 100 μL do antissoro diluído na proporção de 1:2 com uma solução aquosa estéril de NaCl a 0,15 M. Após um período de 2 h da inoculação do antissoro, as reações de PCA foram desencadeadas através da injeção, por via endovenosa, no plexo retro-orbital de cada animal, das amostras das frações F₄₅₋₇₅ oriundas de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas com cinco dias após a semeadura em água destilada. Essas amostras (antígenos) foram aplicadas em volumes de 250 μL , contendo 500 μg de proteína e azul de Evans a 0,5%. Após 30 minutos, os camundongos foram sacrificados em câmara fechada em presença de éter. Em seguida, a pele foi dissecada para a leitura das reações de PCA, observadas através de manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos locais das aplicações dos antissoros, indicando uma reação positiva antígeno-antissoro. Cada teste de PCA foi analisado em comparação a um controle no qual foi injetado no animal o soro pré-imune nas mesmas condições descritas anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Medidas de Crescimento

Como pode ser observado na Figura 2, o estresse salino reduziu os comprimentos das plântulas e retardou seus desenvolvimentos. Enquanto no 5º dia após a semeadura, sob condições controle, as plântulas tinham hipocótilos eretos e folhas cotiledonárias abertas, aquelas do tratamento salino tinham hipocótilo curvo e folhas cotiledonárias não abertas. No 7º dia, as plântulas controle apresentaram-se com epicótilos, enquanto que aquelas do tratamento salino apresentaram hipocótilos eretos e folhas cotiledonárias quase completamente abertas.

Nessas plântulas foram efetuadas medidas de comprimento da raiz principal, da parte aérea e da plântula (Figura 3). A salinidade reduziu, respectivamente, em 56,2, 34,6 e 49,1% os comprimentos da raiz principal, da parte aérea e da plântula no 5º dia após a semeadura (Figura 3A) e em 64,1, 42,7 e 54,6%, respectivamente, os comprimentos dessas mesmas partes no 7º dia após a semeadura (Figura 3B). Nas plântulas com cinco dias após a semeadura, o estresse salino reduziu as matérias frescas do sistema radicular, da parte aérea e da plântula, respectivamente em 36,9, 41,8 e 40,5% (Figura 4A) e nas plântulas com sete dias após a semeadura, essas reduções foram, respectivamente, de 21,1, 38,3 e 34,4% (Figura 4B). Os cotilédones oriundos de plântulas com cinco dias sob condições de estresse salino apresentaram-se com matéria fresca 30,8% maior que aquela dos mesmos provenientes das plântulas controles, enquanto que no 7º dia após a semeadura essa diferença foi de 22,3%, permanecendo as plântulas estressadas com maiores

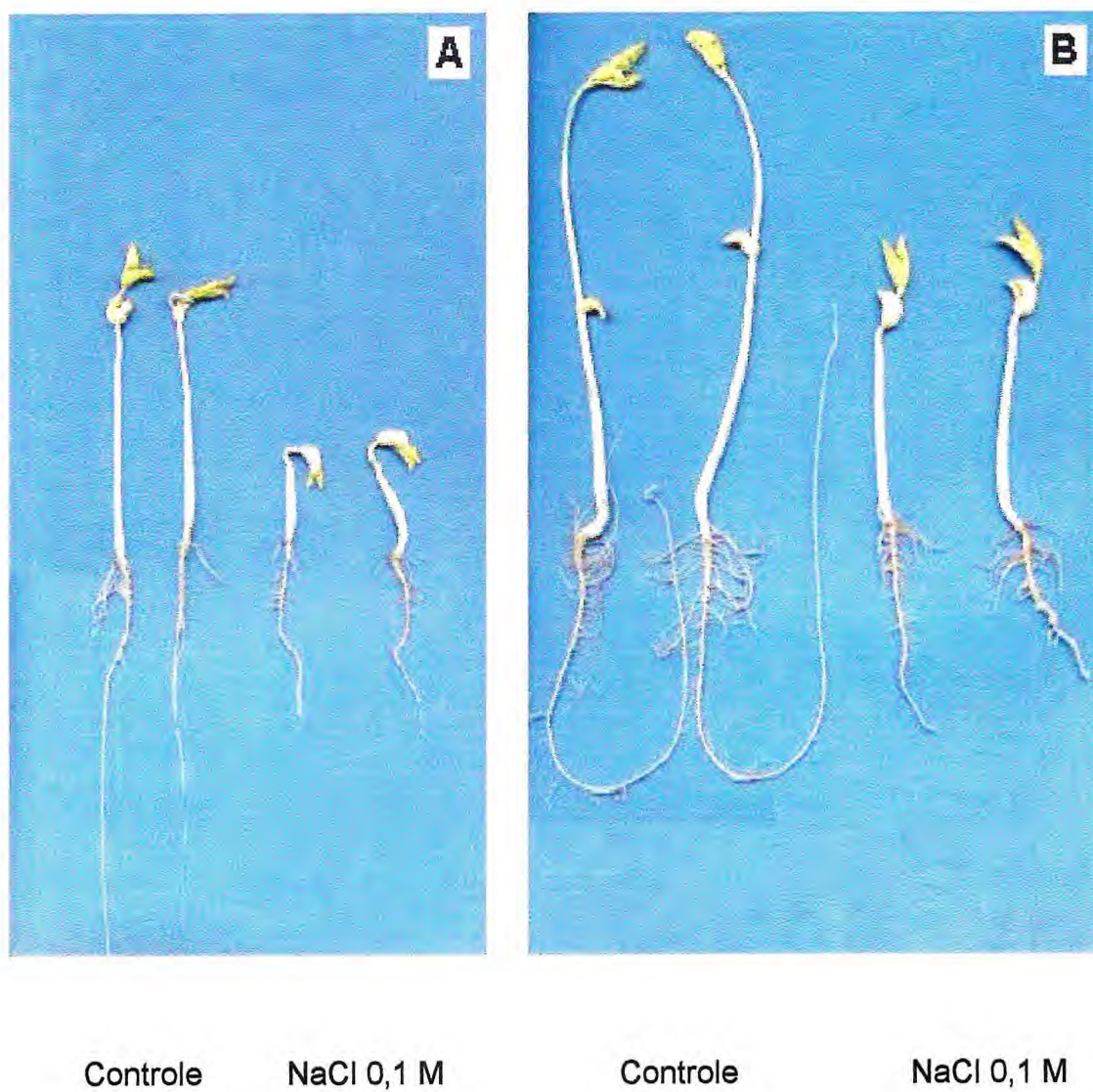


Figura 2. Plântulas de feijão-de-corda Pitiúba com cinco (A) e sete dias (B) após a semeadura em água destilada (controle) e em solução de NaCl 0,1 M.

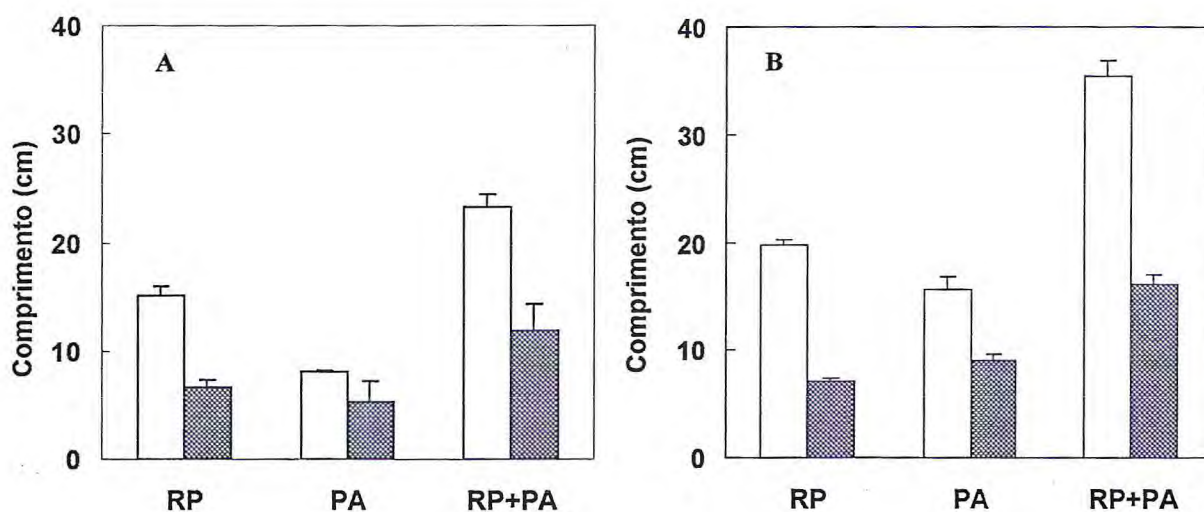


Figura 3. Comprimentos da raiz principal (RP), da parte aérea (PA) e da plântula (RP + PA) de feijão-de-corda Pitiúba com cinco (A) e sete dias (B) após a semeadura em água destilada (□) e em solução de NaCl 0,1 M (▨). As barras representam os desvios padrões.

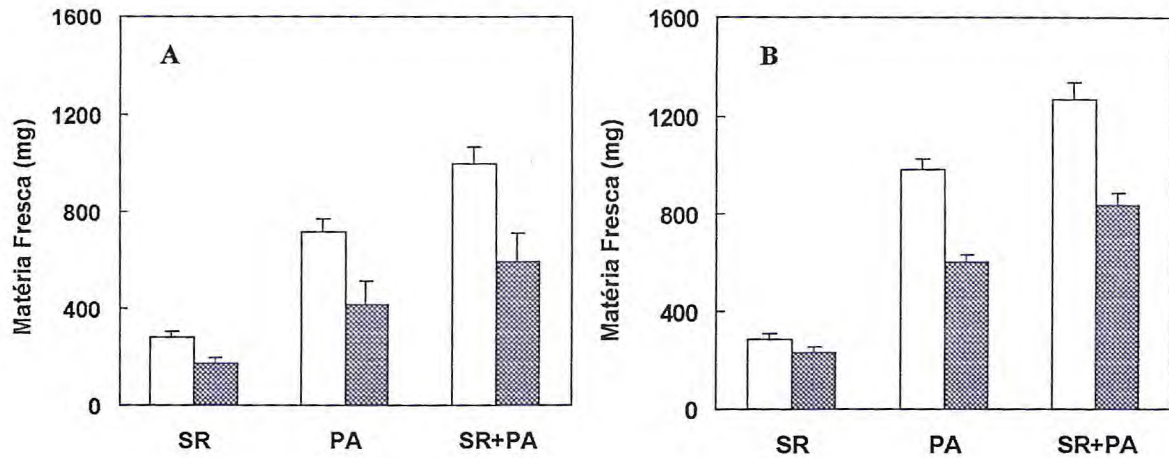


Figura 4. Matérias frescas do sistema radicular (SR), da parte aérea (PA) e da plântula (SR + PA) de feijão-de-corda Pitiúba com cinco (A) e sete dias (B) após a semeadura em água destilada (□) e em solução de NaCl 0,1 M (▨). As barras representam os desvios padrões.

cotilédones (Figura 5).

4.2. Teor de Proteína e Atividade Ribonucleásica

Os teores de proteína (mg.cot^{-1}) dos extratos de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda durante a germinação e estabelecimento da plântula são apresentados na Figura 6. Em condições controle, o teor de proteína mostrou-se decrescente desde o 1º dia após a semeadura até o final do experimento, enquanto que no tratamento salino isto só aconteceu a partir do 3º dia. Todavia, em condições controle, a velocidade com que este teor decresceu foi bem maior que aquela do tratamento salino. Nos 3º e 5º dias, os teores de proteína no tratamento salino foram cerca de 2,0 e 4,0 vezes superiores aqueles dos respectivos controles, tornando-se iguais no final do experimento.

A atividade ribonucleásica específica em extratos de cotilédones de plântulas do tratamento controle, apresentou-se crescente do 1º ao 7º dia após a semeadura, quando a partir daí sofreu pequeno decréscimo, atingindo no 9º dia um valor cerca de 26 vezes maior que aquele de sementes quiescentes (Figura 7A). Em condições de estresse salino, esta atividade também se mostrou crescente, porém menor que aquela do controle, especialmente no 7º dia após a semeadura, quando se apresentou cerca de 63,7% menor. A atividade ribonucleásica total, em condições controle, foi crescente até o 3º dia após a semeadura, quando a partir daí começou a decrescer, atingindo no final do experimento um valor próximo àquele observado para os cotilédones de sementes quiescentes (Figura 7B). Por outro lado, em condições de estresse salino esta atividade mostrou-se crescente até o 7º dia após a semeadura, quando também decresceu e atingiu valor igual àquele apresentado pelo controle no 9º dia. Como pode ser observado, até o 3º dia a atividade ribonucleásica

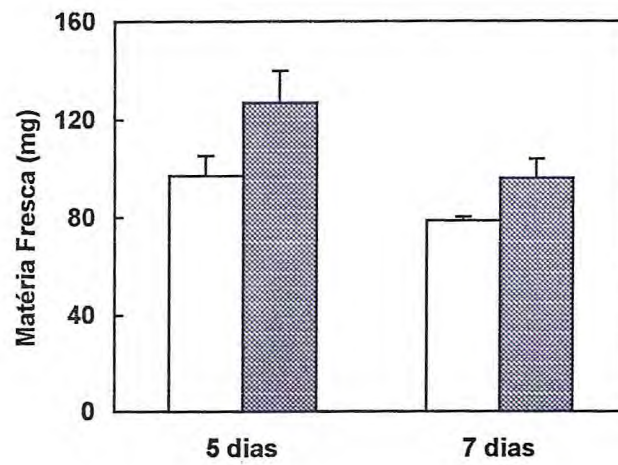


Figura 5. Matéria fresca dos cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba com cinco e sete dias após a sementeira em água destilada (□) e em solução de NaCl 0,1 M (▨). As barras representam os desvios padrões.

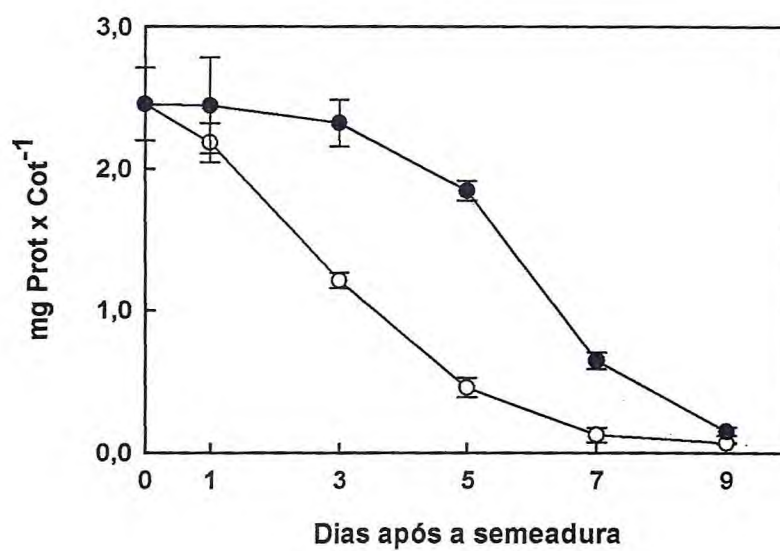


Figura 6. Teor de proteína de extratos de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba em função do tempo de semeadura em água destilada (O) e em solução de NaCl 0,1 M (●). As barras representam os desvios padrão.

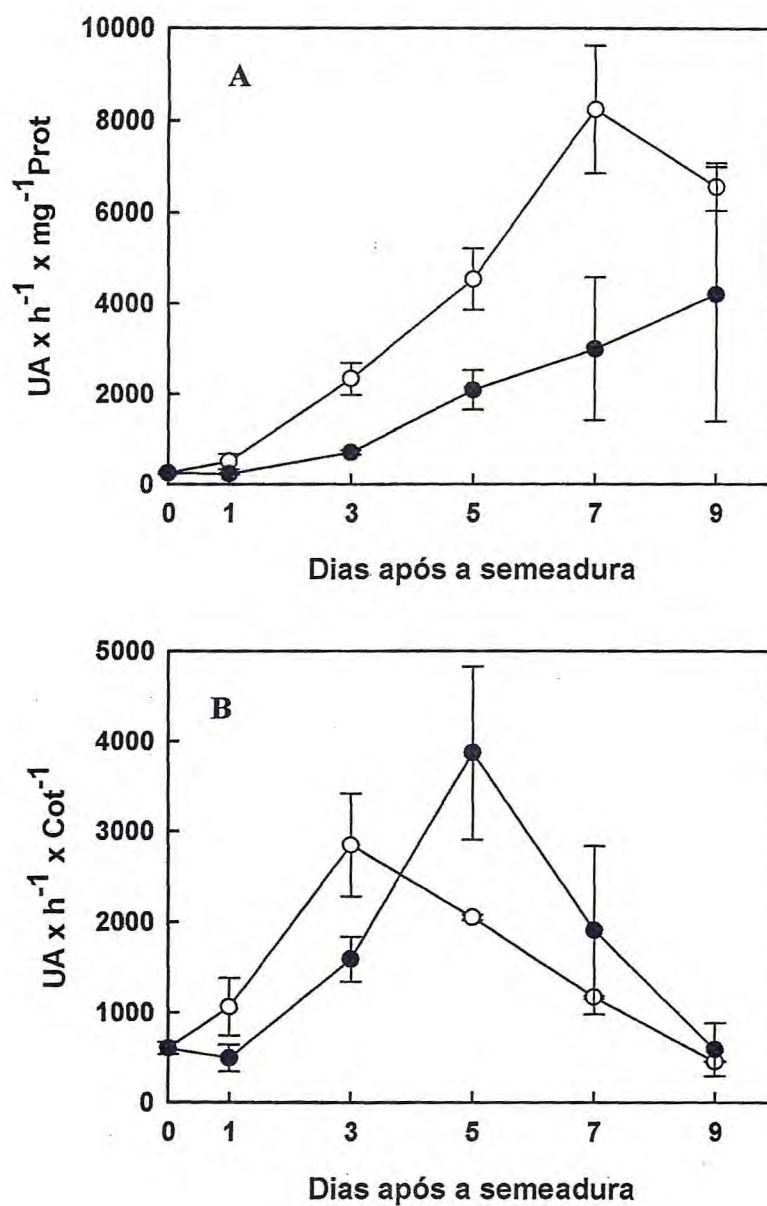


Figura 7. Atividade ribonucleásica específica (A) e total (B) em extratos de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba em função do tempo de sementeira em água destilada (○) e em solução de NaCl 0,1 M (●). As barras representam os desvios padrões.

total no tratamento salino foi sempre inferior àquela do controle. Todavia, no 5º dia após a semeadura a situação se inverteu e a atividade nos cotilédones do tratamento salino foi superior àquela das plântulas controle em cerca de 63,2%.

4.3. Purificação da RNase

As frações obtidas por precipitação dos extratos brutos, das diversas partes das plântulas de feijão-de-corda, com sulfato de amônio, na faixa de 45 a 75% de saturação (F₄₅₋₇₅), foram purificadas através de cromatografia em coluna de CM-Celulose. O resultado dessa cromatografia para a F₄₅₋₇₅ de cotilédones é apresentado na Figura 8. Como pode ser visto, dois picos de proteína foram eluídos da coluna, sendo um não retido e outro retido, sendo este último eluído com um gradiente de NaCl. Nesta fração eluída com o gradiente salino, detectou-se um único pico de atividade ribonucleásica, denominado de fração F_{CM} (Figura 8). A purificação em CM-Celulose das frações F₄₅₋₇₅ de raízes, caules e folhas resultou em perfis cromatográficos semelhantes aos mostrados na Figura 8 (resultados não apresentados). A posterior purificação da F_{CM} de cotilédones por cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-25, resultou também em dois picos de proteína, sendo um não retido e outro retido, o qual foi eluído da coluna com um gradiente salino. Nesta última fração protéica eluída, detectou-se um único pico de atividade ribonucleásica, denominado de fração F_{DEAE} (Figura 9). Esta fração, ao ser purificada por cromatografia em coluna de Sephadex G-50, apresentou-se também como um único pico de atividade e foi denominada de fração F_{G50} (Figura 10).

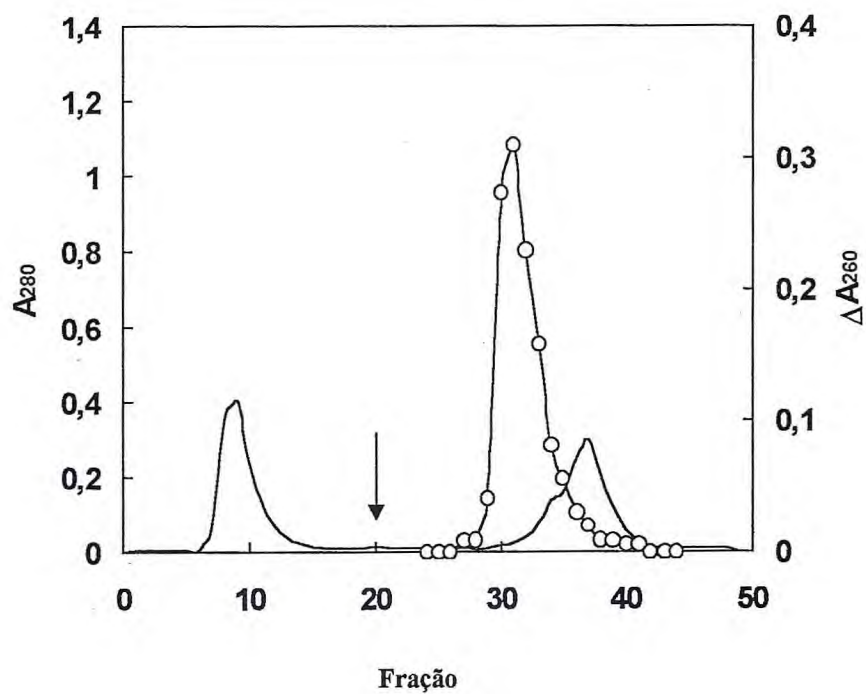


Figura 8. Cromatografia em coluna de CM-Celulose da F_{45-75} de extratos de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada. A seta indica o início da aplicação do gradiente de NaCl. Proteína (A_{280} , —) e atividade ribonucleásica (ΔA_{260} , -O-).

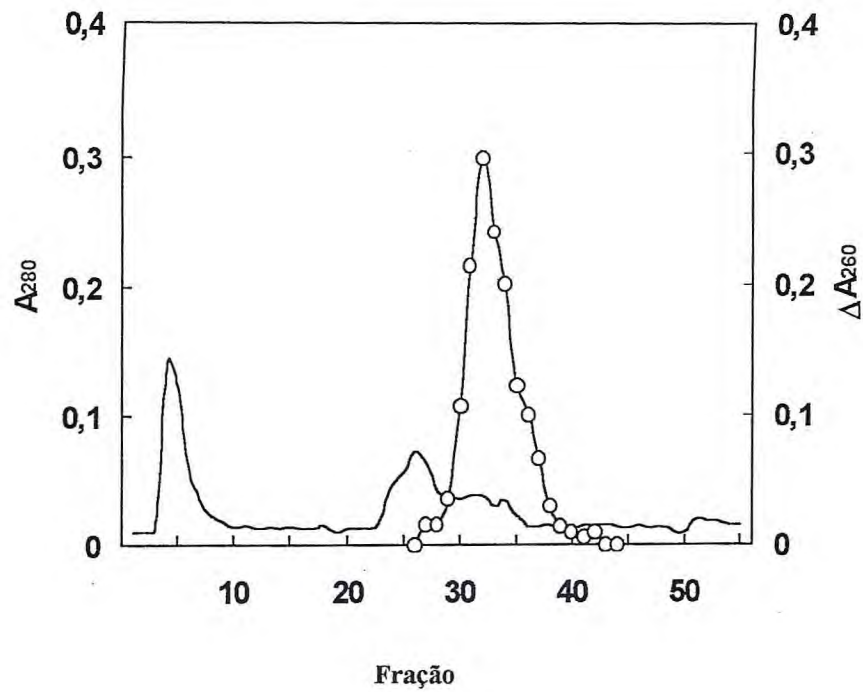


Figura 9. Cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-25 da F_{CM} de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada. A seta indica o início da aplicação do gradiente de NaCl. Proteína (A_{280} , —) e atividade ribonucleásica (ΔA_{260} , —○—).

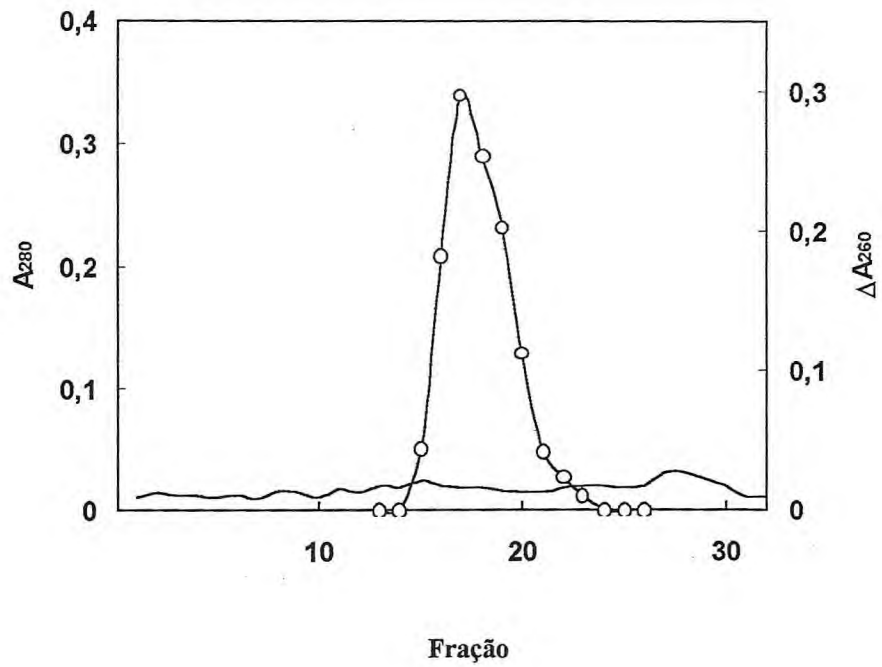


Figura 10. Cromatografia em coluna de Sephadex G-50 da F_{DEAE} de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada. Proteína (A_{280} , —) e atividade ribonucléasica (ΔA_{260} , -○-).

Na Tabela 1 são apresentados os valores de atividade específica das diversas frações purificadas da RNase. As frações F_{45-75} e F_{CM} das diversas partes da plântula apresentaram graus de purificação que variaram, respectivamente, de 2,7 a 23 vezes e de 9,5 a 92 vezes. As frações F_{DEAE} e F_{G50} de cotilédones apresentaram, respectivamente, purificações de 125 e 384 vezes. A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS da F_{G50} resultou numa única banda de proteína com massa molecular de 16,3 kDa (Figura 11).

4.4. Ensaio de ELISA

Os resultados dos ensaios de ELISA dos anticorpos produzidos em camundongos contra a RNase (F_{G50} extraída do gel de poliacrilamida) contra os extratos brutos de cotilédones, provenientes de plântulas com 0, 1, 3, 5 e 7 dias após a semeadura em condições controle e de estresse salino são apresentados na Figura 12. Como pode ser observado, a presença de RNase foi detectada nos extratos de sementes quiescentes, em quantidade que se manteve praticamente constante até o 3º dia após a semeadura, tanto em condições controle como de estresse salino. No entanto, com cinco e sete dias após a semeadura em condições controle, a quantidade de RNase foi aproximadamente igual à metade daquela observada na semente quiescente. No 5º dia, a quantidade de RNase nos cotilédones do tratamento salino apresentou-se cerca de 78% maior que aquela sob condições controle, embora no 7º dia não tenham sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos controle e salino.

A existência de RNases, em outras partes da plântula, imunologicamente idênticas

Tabela 1. Purificação da RNase extraída de cotilédones, raízes, caules e folhas de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada. Os números entre parênteses representam o grau de purificação (x).

Etapas	UA.h ⁻¹ .mg ⁻¹ Prot			
	Cotilédones	Raízes	Caules	Folhas
Extrato bruto	4732 (1)	4283 (1)	2056 (1)	1560 (1)
F ₄₅₋₇₅	107890 (23)	60492 (14,1)	18870 (9,2)	4189 (2,7)
F _{CM}	334986 (71)	395229 (92)	75000 (37)	14823 (9,5)
F _{DEAE}	591780 (125)	-	-	-
F _{G50}	1818000 (384)	-	-	-

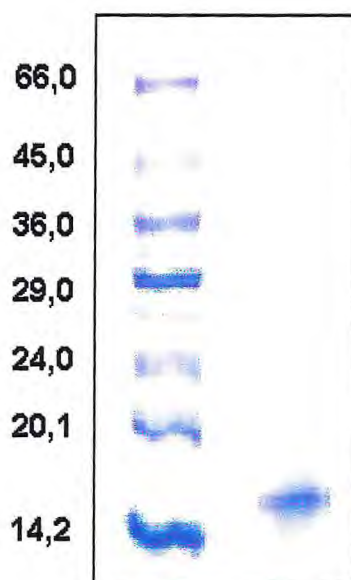


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, da fração purificada da RNase (F_{GS0}) de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada. Os números à esquerda indicam as massas moleculares dos marcadores (kDa).

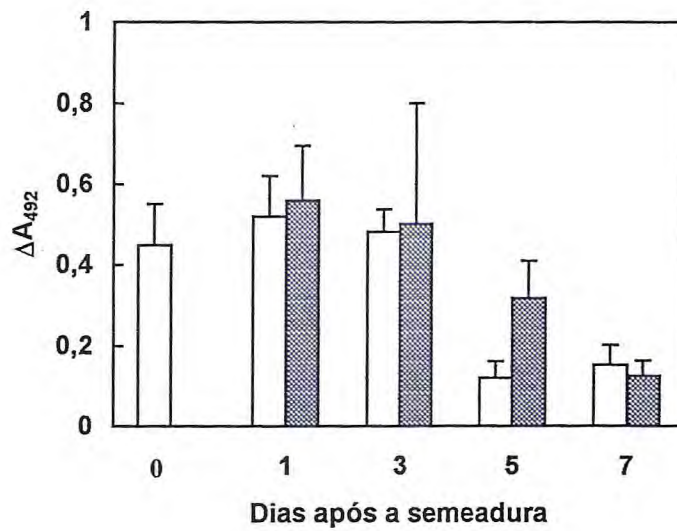


Figura 12. Teste de ELISA para detecção de RNase nos extratos brutos de cotilédones de feijão-de-corda Pitiúba em função do tempo de semeadura em água destilada (□) e em solução de NaCl 0,1 M (▨). As barras representam os desvios padrões.

àquela purificada de cotilédones também foi comprovada por ELISA nos extratos brutos de raízes, caules e folhas de plântulas com cinco dias após a semeadura em água destilada (Figura 13).

4.5. Detecção de RNase por Anafilaxia Cutânea Passiva

As reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA) foram feitas em camundongos injetados com o soro de camundongos imunizados com a RNase cotiledonária purificada (fração F_{G50} extraída do gel de poliacrilamida) e desencadeadas por via endovenosa com as F_{45-75} das diversas partes da plântula de feijão-de-corda, com cinco dias após a semeadura em água destilada. Os resultados apresentados na Figura 14 mostram a presença de anticorpos (IgG1) contra a RNase cotiledonária nas frações de raízes, caules, folhas e cotilédones. A comprovação disso deveu-se ao extravasamento do corante azul de Evans nos pontos da região dorsal dos camundongos, indicativo de uma reação antígeno-anticorpo. Experimento semelhante, no qual o camundongo foi sensibilizado com o soro pré-imune e injetado com a F_{45-75} de cotilédones (controle) não apresentou extravasamento desse corante, demonstrando a ausência de anticorpos neste soro contra a RNase purificada de cotilédones. Controles semelhantes a este, porém nos quais foram injetados nos camundongos sensibilizados com o soro pré-imune as frações F_{45-75} de raízes, caules e folhas apresentaram resultados semelhantes (dados não apresentados).

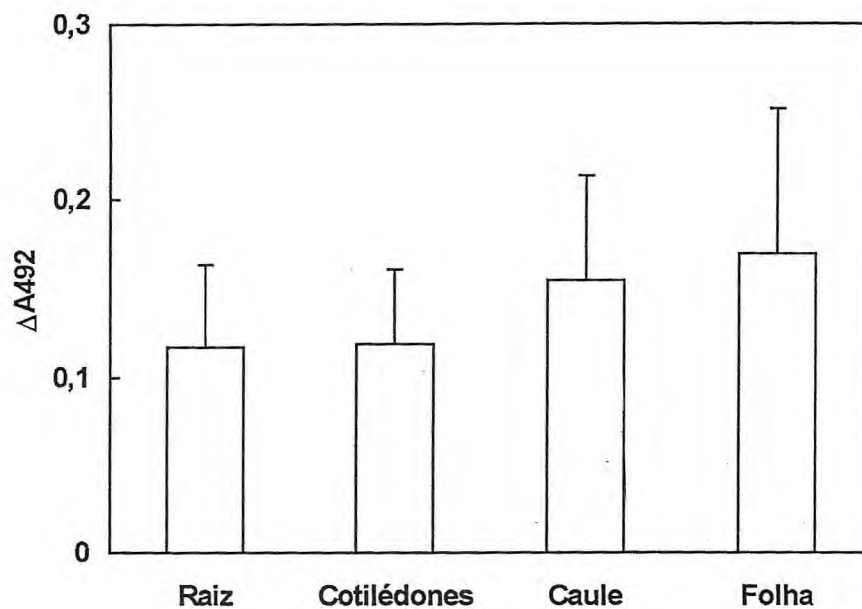


Figura 13. Detecção de RNase pelo teste de ELISA, em extratos brutos de raízes, cotilédones, caules e folhas de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada. As barras representam os desvios padrões.

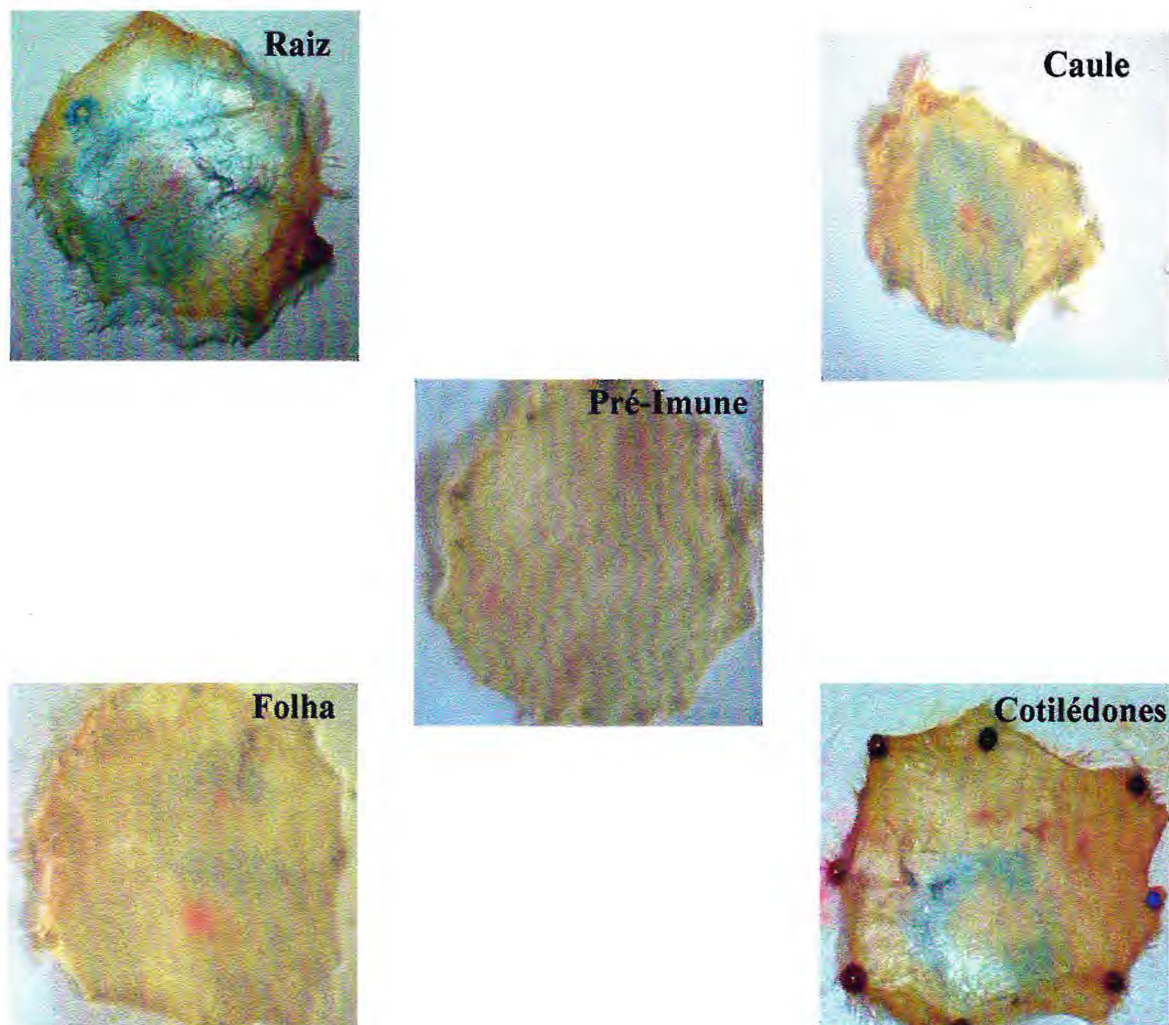


Figura 14. Reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em camundongos imunizados com a RNase cotiledonária purificada (F_{G50} extraída do gel de poliacrilamida). Os soros dos animais imunizados (diluição 1:2, 100 μ L) foram injetados intradermicamente. Na figura central, foi injetado na pele do animal 100 μ L de soro não imunizado tomado como controle (soro pré-imune). A reação foi desencadeada, em todos os casos, com 500 μ g de proteína das frações F_{45-75} de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada, associados com azul de Evans, como descrito no Materiais e Métodos. No caso do controle, a reação foi desencadeada com a fração F_{45-75} de cotilédones.

4.6. Isoenzimas de RNase

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida de coloração negativa para detecção de isoenzimas de RNase nas frações F_{CM} de raízes, caules, folha e cotilédones, bem como na fração mais purificada da enzima de cotilédones (F_{G50}) são apresentados na Figura 15. Todas as frações analisadas apresentaram, pelo menos, duas isoenzimas de RNase com velocidades de migração muito próximas entre si, porém em intensidades variadas. Essas isoenzimas nas frações F_{CM} de caules e folhas apresentaram-se em intensidades menores que aquelas de raízes e, mais ainda, em relação às aquelas provenientes das frações F_{CM} e F_{G50} de cotilédones. Deve-se ressaltar, no entanto, que as frações F_{CM} de caules e folhas, foram aplicadas no gel em menores quantidades de atividade ribonucleásica que as outras frações.

4.7. Atividade Desoxirribonucleásica das Frações F_{45-75} , F_{CM} e F_{G50}

4.7.1. Pelas leituras de A_{260}

Utilizando frações F_{45-75} das diversas partes da plântula, com cinco dias após a semeadura em água destilada, e com elevadas atividades contra RNA (ΔA_{260} próximo a 1,000), foi detectada em todas elas atividade desoxirribonucleásica (Tabela 2). Como pode ser observado, os valores de atividade contra o DNA das frações F_{45-75} de raízes, caules, folhas e cotilédones corresponderam, respectivamente, a 7,6, 5,9, 16,2 e 11,4% daqueles de atividades ribonucleásicas. Todavia, com relação às frações F_{CM} das várias partes da plântula, também em condições de elevada atividade ribonucleásica, não foram detectados

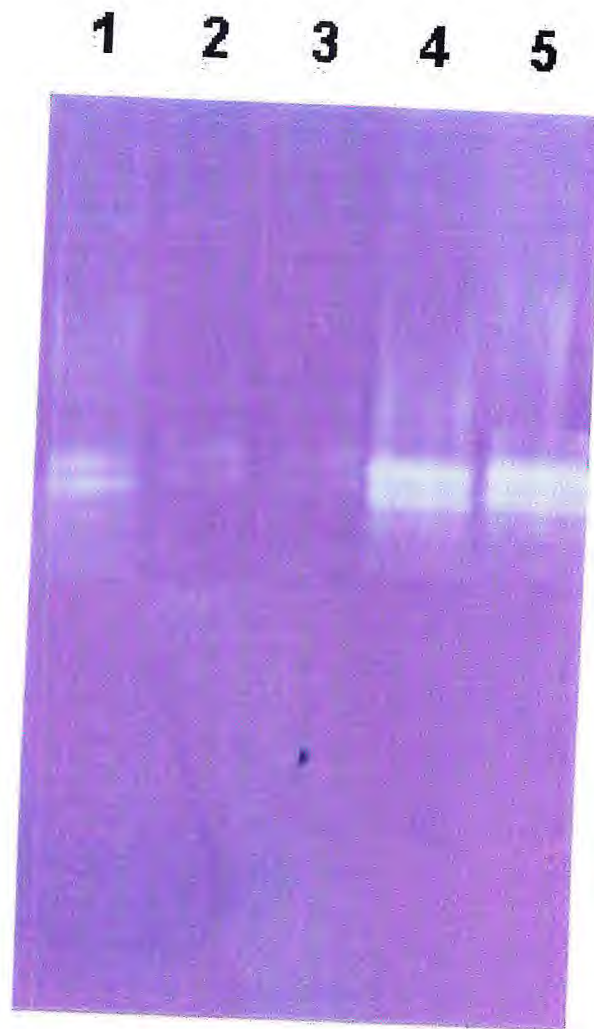


Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de RNase nas F_{CM} de raízes (1), caules (2), folhas (3) e cotilédones (4) e na F_{GS0} (5) de cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura em água destilada.

Tabela 2. Atividade enzimática das frações F_{45-75} e F_{CM} de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba em relação aos substratos RNA e DNA. Os valores representam médias de três repetições.

Etapas	ΔA_{260}			
	F_{45-75}		F_{CM}	
	RNA	DNA	RNA	DNA
Raízes	1,020	0,070	1,259	Traços
Caules	1,058	0,062	0,974	Traços
Folhas	1,200	0,194	1,019	Traços
Cotilédones	1,050	0,110	0,988	Traços

valores significativos de atividades desoxirribonucleásicas (ΔA_{260} próximo a zero), como pode ser observado na Tabela 2.

Utilizando frações F_{45-75} 3 a 10 vezes mais concentradas que aquelas empregadas nos experimentos apresentados na Tabela 2, testou-se o efeito do EDTA na atividade desoxirribonucleásica (Tabela 3). Este quelante, na concentração final de 3 mM na mistura de reação, inibiu, respectivamente 39,1, 39,7, 51,6 e 64,1% desta atividade, nas F_{45-75} de raízes, caules, folhas e de cotilédones, respectivamente.

4.7.2. Por eletroforese em gel de agarose

Para estudar a capacidade das frações F_{CM} e F_{G50} de hidrolisarem o DNA, testou-se de forma preliminar o efeito dos seguintes tratamentos térmicos sobre a integridade do DNA λ (linear): 80°C, por 5 min; 90°C, por 1 min e 100°C, por 1, 2 e 4 min (Figura 16). Como pode ser visto, com exceção do tratamento de temperatura a 90°C, por 1 min (poço 2), todos os outros provocaram degradações no DNA, identificadas pela emissão de fluorescência do brometo de etídeo ligado aos produtos de hidrólise (região descorada abaixo da banda principal correspondente ao DNA). Portanto, todo o estudo sobre a atividade desoxirribonucleásica através de eletroforese em gel de agarose foi feito com o DNA tratado a 90°C por 1 min.

Tabela 3. Efeito do EDTA na atividade desoxirribonucleásica das frações F₄₅₋₇₅ de raízes, caules, folhas e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, com cinco dias após a semeadura. Os valores são expressos como percentagem dos controles (ensaio sem adição de EDTA) e representam médias de três repetições

Órgãos	Atividade (% do controle)
Raízes	39,1
Caules	39,7
Folhas	51,6
Cotilédones	64,1

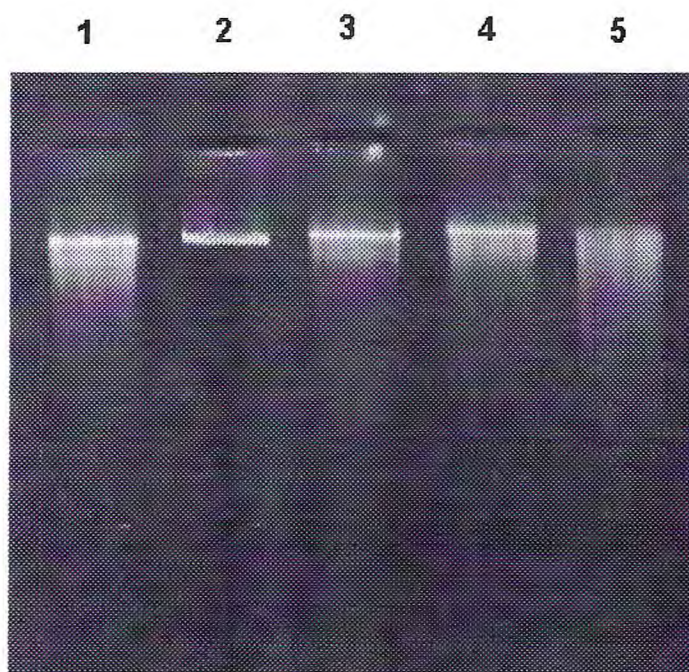


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose para detectar o efeito do tratamento térmico sobre o DNA (linear). O DNA foi submetido aos seguintes tratamentos: 85°C por 5 min (poço 1); 90°C por 1 min (poço 2); 100°C por 1 min (poço 3); 100°C por 2 min (poço 4) e 100°C por 4 min (poço 5). Em seguida, as amostras do DNA a $0,05 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ (em tampão acetato 0,1 M, pH 5,8) foram incubadas por 1 h a 40°C. Em cada poço foram aplicados 4 μg de DNA.

4.7.2.1. Em frações F_{CM} com mesmas unidades de atividade (UA)

As atividades desoxirribonucleásicas das F_{CM} das diversas partes da plântula foram, inicialmente, determinadas em preparações dotadas de iguais quantidades de atividade ribonucleásica. Estas frações quando incubadas com RNA em condições idênticas às aquelas dos ensaios usando-se o DNA como substrato, hidrolisaram completamente o RNA entre 5 e 10 min (Figura 17). Todavia, conforme mostrado na eletroforese em gel de agarose da Figura 18, quando o DNA foi usado como substrato destas frações, ele foi fortemente degradado pela F_{CM} de caule (poço 3) e apenas parcialmente pelas outras frações, mesmo por um tempo de reação de 90 min. Portanto, em termos de atividade desoxirribonucleásica, a F_{CM} que se mostrou mais ativa foi a de caule, seguida, respectivamente, pelas de folhas, raízes e cotilédones. O controle, DNA incubado sem a enzima (poço 1), não sofreu nenhuma degradação quando incubado a 40°C por 90 min (que foram as condições empregadas no ensaio).

4.7.2.2. Efeito do EDTA e do $MgCl_2$ na atividade desoxirribonucleásica das frações

F_{CM} e F_{G50}

Na Figura 19 são mostrados os efeitos do EDTA e do $MgCl_2$ sobre as atividades desoxirribonucleásicas, das frações F_{CM} de raízes e cotilédones em concentrações mais elevadas que aquelas empregadas no experimento da Figura 18. Após 1h de reação, a hidrólise do DNA foi pouco evidenciada na F_{CM} de raízes (poços 4, 5 e 6), porém facilmente visualizadas nas frações F_{CM} de caules (poços 7, 8 e 9) e folhas (poços 10, 11 e 12), como mostrado na Figura 19A. Contudo, nesse tempo de reação, o efeito inibitório do EDTA, embora pequeno, foi detectado nas frações F_{CM} de raízes e folhas (poços 6 e 12, na

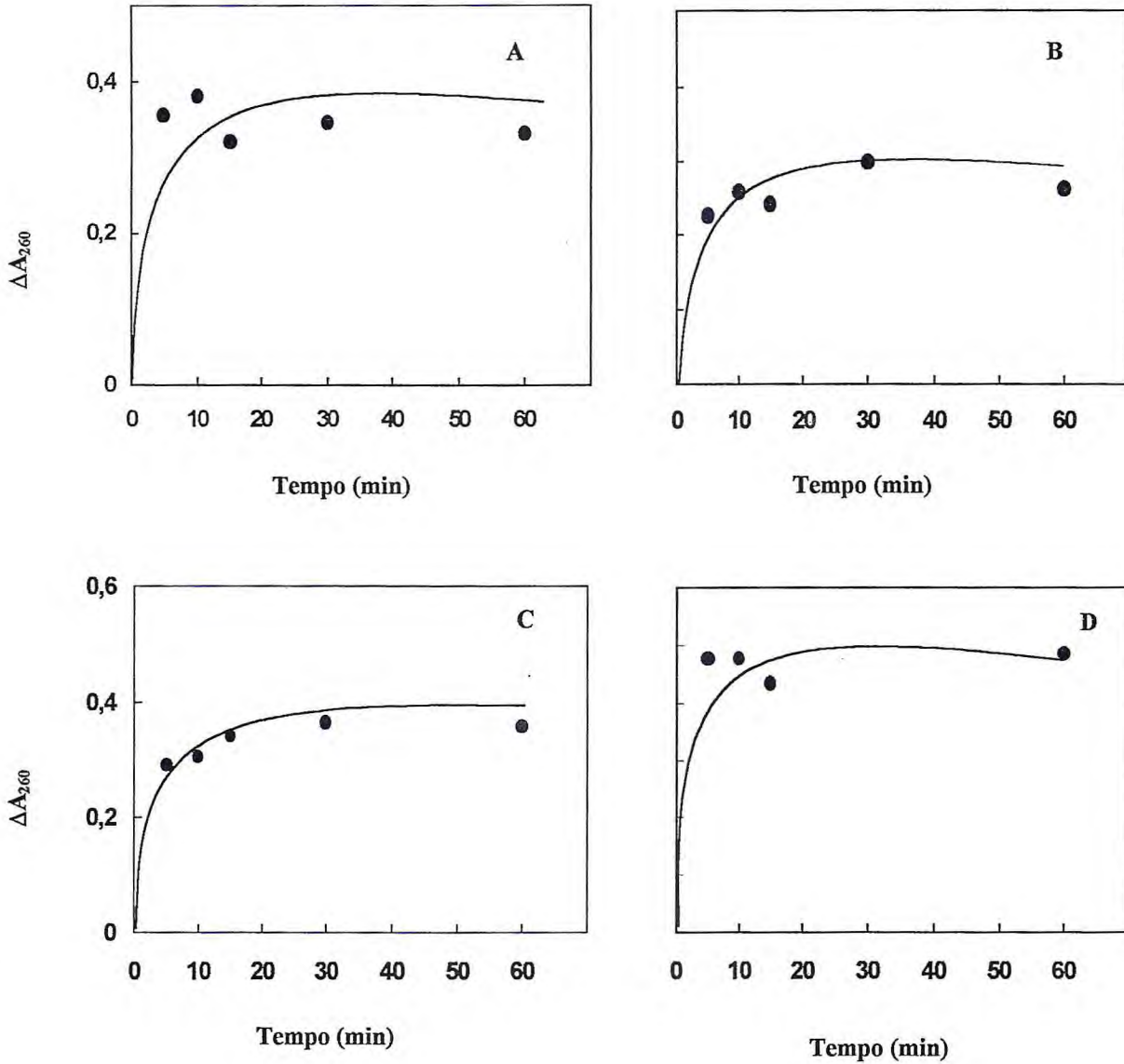


Figura 17. Atividade ribonucleásica das frações F_{CM} de raízes (A), caules (B), folhas (C) e cotilédones (D) de plântulas de feijão-de-corda Pitiúba, em função do tempo de reação, com RNA na concentração final de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$.

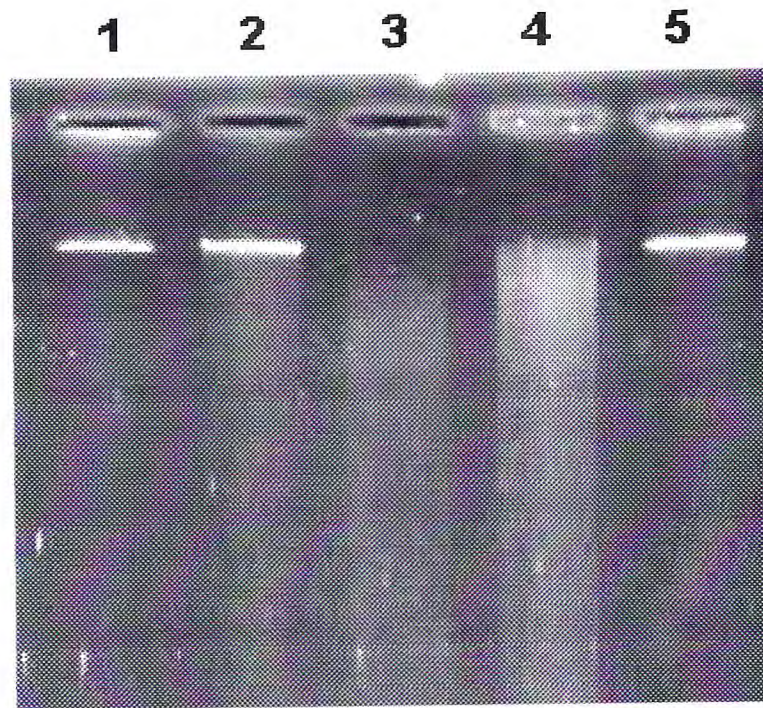


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose para detecção de atividade desoxirribonucleásica das frações F_{CM} de raízes (poço 2), caules (poço 3), folhas (poço 4) e cotilédones (poço 5) de plântulas de feijão-de-corda, com cinco dias após a semeadura em água destilada, utilizando como substrato o DNA linear. Todas as frações foram incubadas com o DNA por 1 h e continham $500 \text{ UA} \times \text{h}^{-1}$. Como controle (poço 1), foi usado DNA incubado em iguais condições, porém em ausência da enzima. Em cada poço foram aplicados $4 \mu\text{g}$ de DNA.

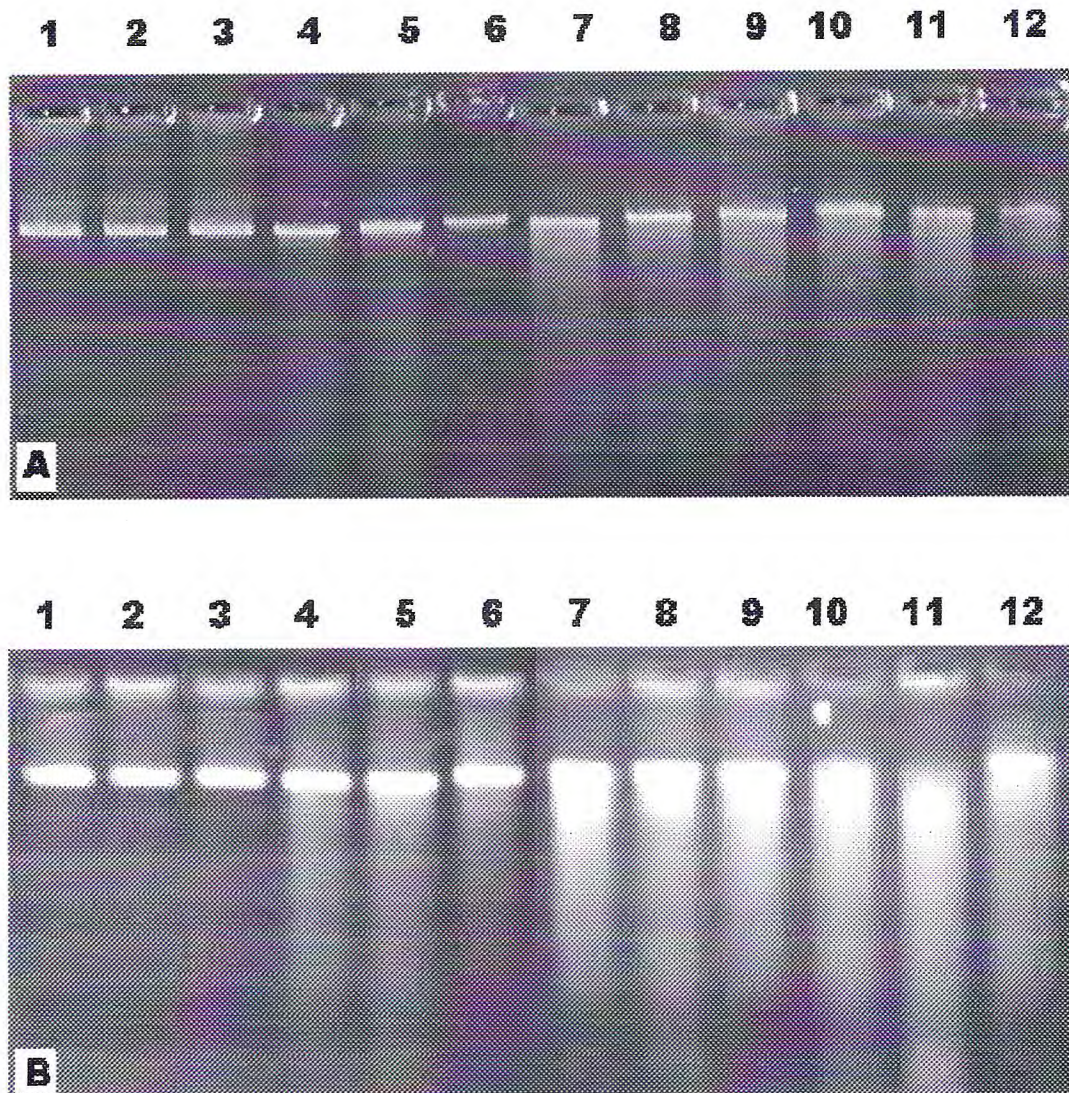


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose para detectar os efeitos do $MgCl_2$ e do EDTA sobre a atividade desoxirribonucleásica das F_{CM} de raízes, caules e folhas em dois tempos de reação: 1 (A) e 3 h (B), sendo usado como substrato o DNA linear. Foram usados três controles: poço 1 (DNA incubado sem a enzima); poço 2 (DNA + $MgCl_2$ incubados sem a enzima) e poço 3 (DNA + EDTA incubados sem a enzima). Nos conjuntos de poços 4, 5 e 6; 7, 8 e 9 e 10, 11 e 12, foram utilizadas amostras de raízes, caules e folhas, respectivamente, sendo incubadas com DNA (poços 4, 7 e 10), com DNA + $MgCl_2$ (5, 8 e 11) e com DNA + EDTA (6, 9 e 12). Em cada poço foram aplicados 4 μg de DNA.

Figura 19A). Com 3 h de reação, a atividade desoxirribonucleásica da fração F_{CM} de raízes tornou-se mais evidente, bem como o efeito inibitório do EDTA, conforme pode ser visto no poço 6 da Figura 19B, onde a degradação do DNA foi nitidamente menor que aquele no poço 4 (F_{CM} de raiz incubada sem EDTA). Também, com este mesmo tempo de reação, os resultados mostraram que o $MgCl_2$ causou um pequeno estímulo na atividade desoxirribonucleásica das F_{CM} de caules e folhas (respectivamente, poços 8 e 11, na Figura 19B). Todavia, tal efeito não foi observado na fração F_{CM} de raízes (poço 5) que apresentou degradação do DNA semelhante àquela do poço 4 (enzima incubada sem o $MgCl_2$). De acordo com os resultados apresentados na Figura 19B, também foi demonstrado que o EDTA, além de inibir a atividade desoxirribonucleásica da fração de folhas (poço 12), também inibiu aquela de raízes (poço 6), porém este efeito inibitório não foi evidenciado na fração de caules (poço 9). Por outro lado, como visto na eletroforese da Figura 20, o efeito inibitório do EDTA e o de ativador do $MgCl_2$ sobre a atividade desoxirribonucleásica foi claramente evidenciado na F_{CM} de cotilédones (poços 4, 5 e 6), embora tal efeito tenha sido menos evidente na fração mais purificada desta mesma enzima (F_{G50}) (poços 7, 8 e 9). Como mostrado nas Figuras 19 e 20, os controles (DNA incubado sem a enzima em ausência ou presença de $MgCl_2$ ou EDTA, respectivamente, poços 1, 2 e 3) não apresentaram degradações do DNA.

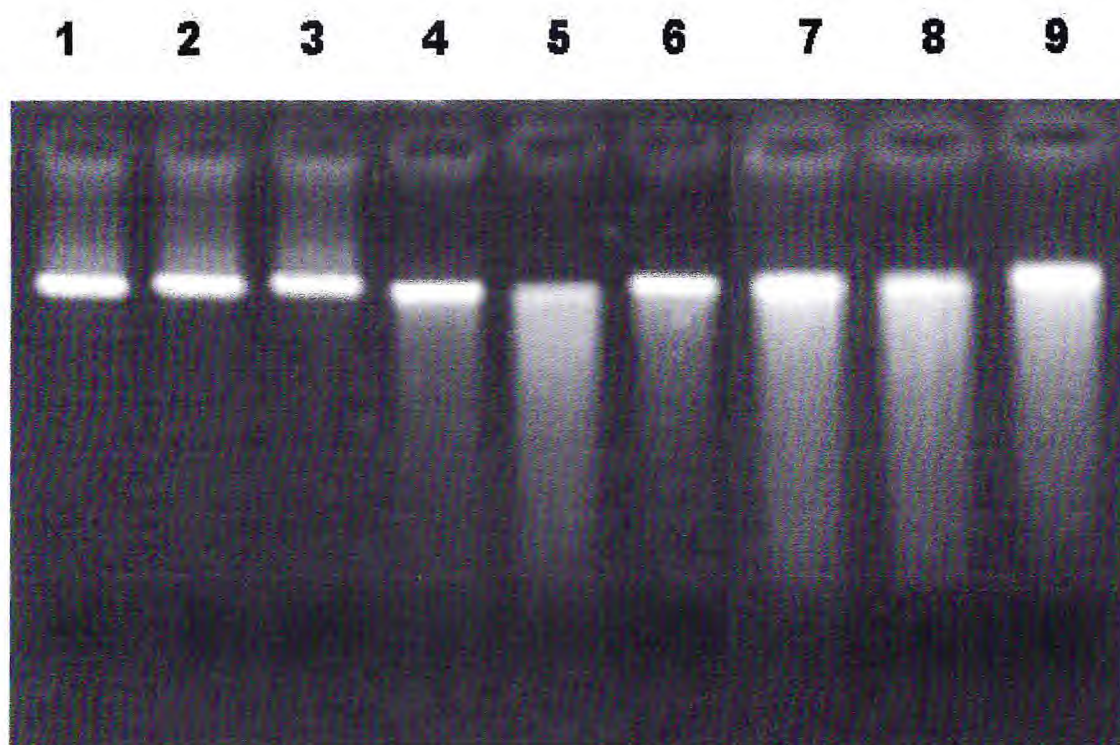


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose para detectar os efeitos do $MgCl_2$ e do EDTA sobre a atividade desoxirribonucleásica das F_{CM} e F_{G50} de cotilédones, no tempo de reação de 1 h, sendo usado como substrato o DNA linear. Foram usados três controles: poço 1 (DNA incubado sem a enzima); poço 2 (DNA + $MgCl_2$ incubados sem a enzima) e poço 3 (DNA + EDTA incubados sem a enzima). Nos poços 4, 5 e 6 e 7, 8 e 9, respectivamente, as frações F_{CM} e F_{G50} , foram incubadas com DNA, com DNA + $MgCl_2$ e com DNA + EDTA, respectivamente. Em cada poço foram aplicados 4 μg de DNA.

4.7.2.3. Efeito dos íons Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} sobre a atividade desoxirribonucleásica da fração F_{G50}

Os efeitos dos íons Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} sobre a atividade desoxirribonucleásica da fração mais purificada da enzima de cotilédones (F_{G50}) estão mostrados na eletroforese da Figura 21. Embora as bandas correspondentes ao DNA não tenham se apresentado muito nítidas, nota-se claramente uma forte hidrólise do DNA no poço 4 (enzima incubada com DNA em ausência dos íons), e pouca hidrólise nos poços 5, 6 e 7 nos quais a enzima foi incubada, respectivamente, com os íons Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} .

4.7.2.4. Efeito da concentração de RNA na atividade desoxirribonucleásica da fração F_{G50}

A atividade desoxirribonucleásica da fração F_{G50} foi estudada em função de concentrações crescentes de RNA na mistura de reação. As eletroforeses apresentadas na Figura 22 mostram os efeitos do RNA em quatro tempos de reação. Com 30 min (Figura 22A), a hidrólise do DNA (poço 2, enzima incubada sem RNA) foi progressivamente inibida por concentrações crescentes de RNA, sendo este efeito mais evidente nos poços 5 e 6, quando na mistura de reação, o RNA se encontrava, respectivamente, em concentrações iguais a 25 e 50 vezes aquela do DNA, quando não se observou nenhuma atividade desoxirribonucleásica. Com 60 min (Figura 22B) e 90 min de reação (Figura 22C) esta inibição progressiva da atividade desoxirribonucleásica pelo RNA, também foi observada, e a hidrólise do DNA somente se tornou evidente em meios de reação contendo RNA em concentrações iguais ou abaixo de 25 vezes aquela do DNA (poço 5). Nestes dois últimos tempos de reação, praticamente não se detectou hidrólise do DNA quando

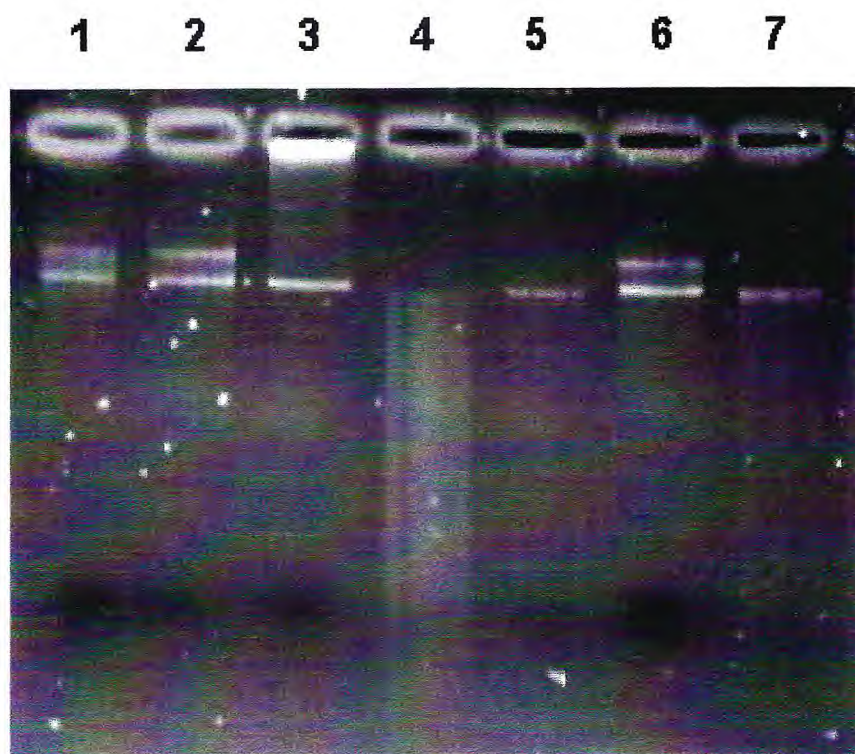


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose para detectar os efeitos dos íons Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} sobre a atividade desoxirribonucleásica da fração F_{G50} de cotilédones, no tempo de reação de 1 h, usando-se o DNA linear como substrato. Foram usados três controles: poço 1 (DNA + Cu^{2+} incubados sem a enzima); poço 2 (DNA + Hg^{2+} incubados sem a enzima) e poço 3 (DNA + Zn^{2+} incubados sem a enzima). Nos poços 4, 5, 6 e 7, respectivamente, a fração F_{G50} , foi incubada com DNA, DNA + Cu^{2+} , DNA + Hg^{2+} e DNA + Zn^{2+} , respectivamente. Em cada poço foram aplicados 4 μg de DNA.

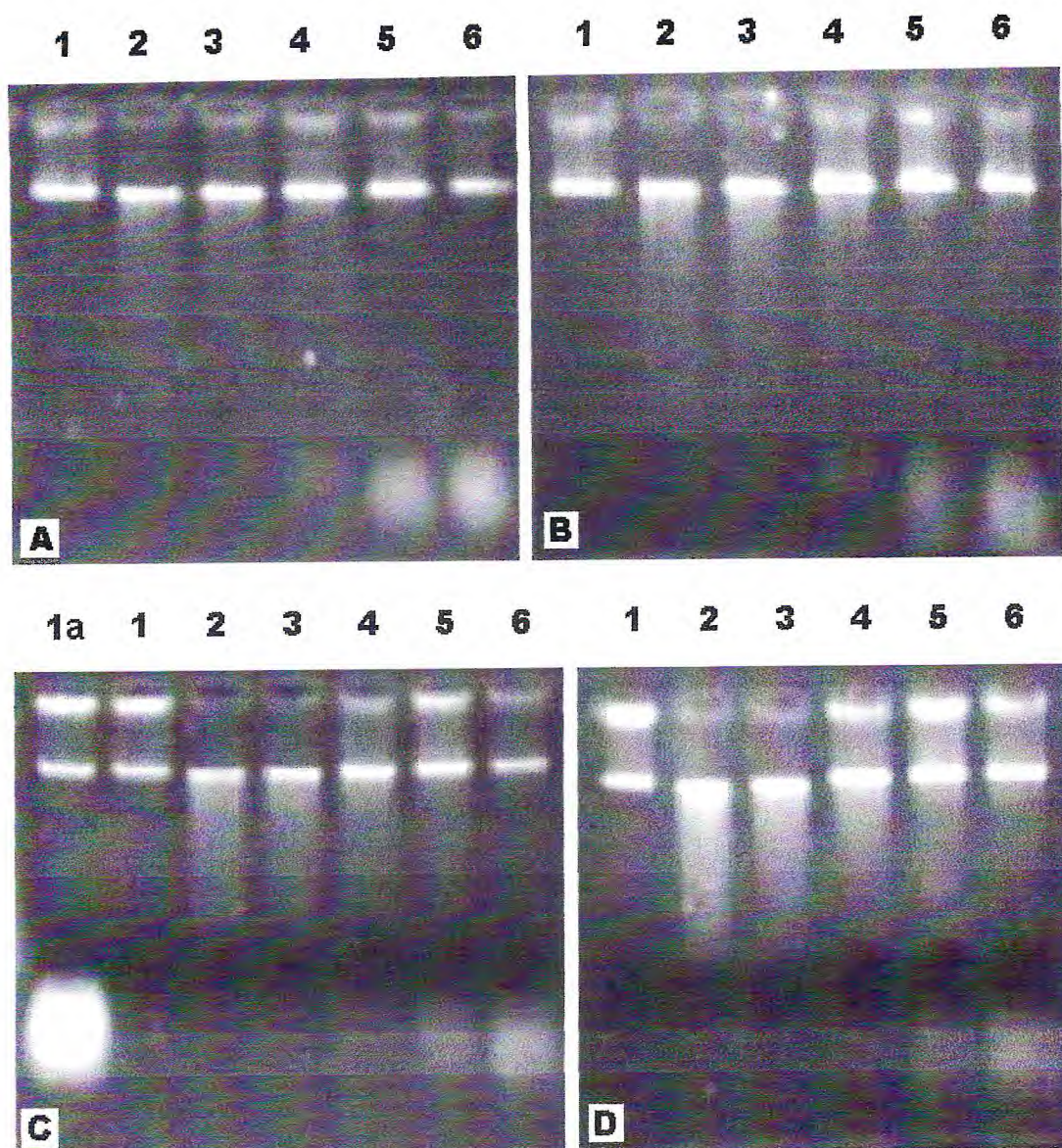


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose para detectar o efeito de concentrações crescentes de RNA sobre a atividade desoxirribonucleásica da fração purificada da RNase cotiledonária (F_{G50}), nos tempos de reação de 30 (A), 60 (B), 90 (C) e 120 min (D), sendo usado como substrato o DNA linear. Nos poços 2, 3, 4, 5 e 6 a enzima foi incubada com DNA (linear), contendo RNA em concentrações iguais a 0, 1, 10, 25 e 50 vezes aquela do DNA, respectivamente. Foram usados dois controles: DNA incubado sem a enzima (poço 1) e DNA incubado sem a enzima, contendo RNA numa concentração igual a 50 vezes aquela do DNA (poço 1a). Em cada poço foram aplicados 4 μ g de DNA.

o RNA foi adicionado na mistura de reação na concentração igual a 50 vezes aquela do DNA (poço 6); aos 120 min de reação (Figura 22D) também foi observada uma inibição progressiva na hidrólise do DNA em função de concentrações crescentes de RNA, porém diferentemente dos outros tempos de reação, observou-se uma pequena hidrólise do DNA no poço 6. Como controle desse experimento, no poço 1, o DNA foi incubado em ausência da enzima, que como pode ser visto não sofreu degradação. Também foi feito um outro controle, onde se incubou o DNA em ausência da enzima, porém contendo RNA em concentração igual a 25 vezes aquela do DNA (poço 1a, na Figura 22C). Portanto, a forte mancha branca que aparece abaixo da banda correspondente ao DNA neste poço representa o RNA ligado ao brometo de etídeo. Contudo, quando estes dois substratos foram usados na mistura de reação, na mesma proporção, porém em presença da enzima (poço 6), esta mancha correspondente ao RNA apresentou-se com intensidade muito mais fraca, indicando que o mesmo foi fortemente hidrolisado após 90 min de reação.

4.7.2.5. Efeito da fração F_{G50} sobre o DNA circular

A capacidade da fração F_{G50} de hidrolisar o DNA circular foi analisada em presença e ausência de EDTA e $MgCl_2$, e nos tempos de reação de 1, 2, 4 e 18 h (Figura 23). Após 1 h de reação, o DNA circular se apresentou como duas bandas, em função da ação da enzima sobre o DNA em ausência de efetores (poço 4) ou em presença de $MgCl_2$ (poço 5) e EDTA (poço 6), diferentemente do DNA nos poços 1, 2 e 3 (controles sem a enzima) que se apresentou como uma única banda (Figura 23A). Esta banda nova que surgiu apresentou mobilidade menor que aquela do DNA nos controles. No entanto, com este

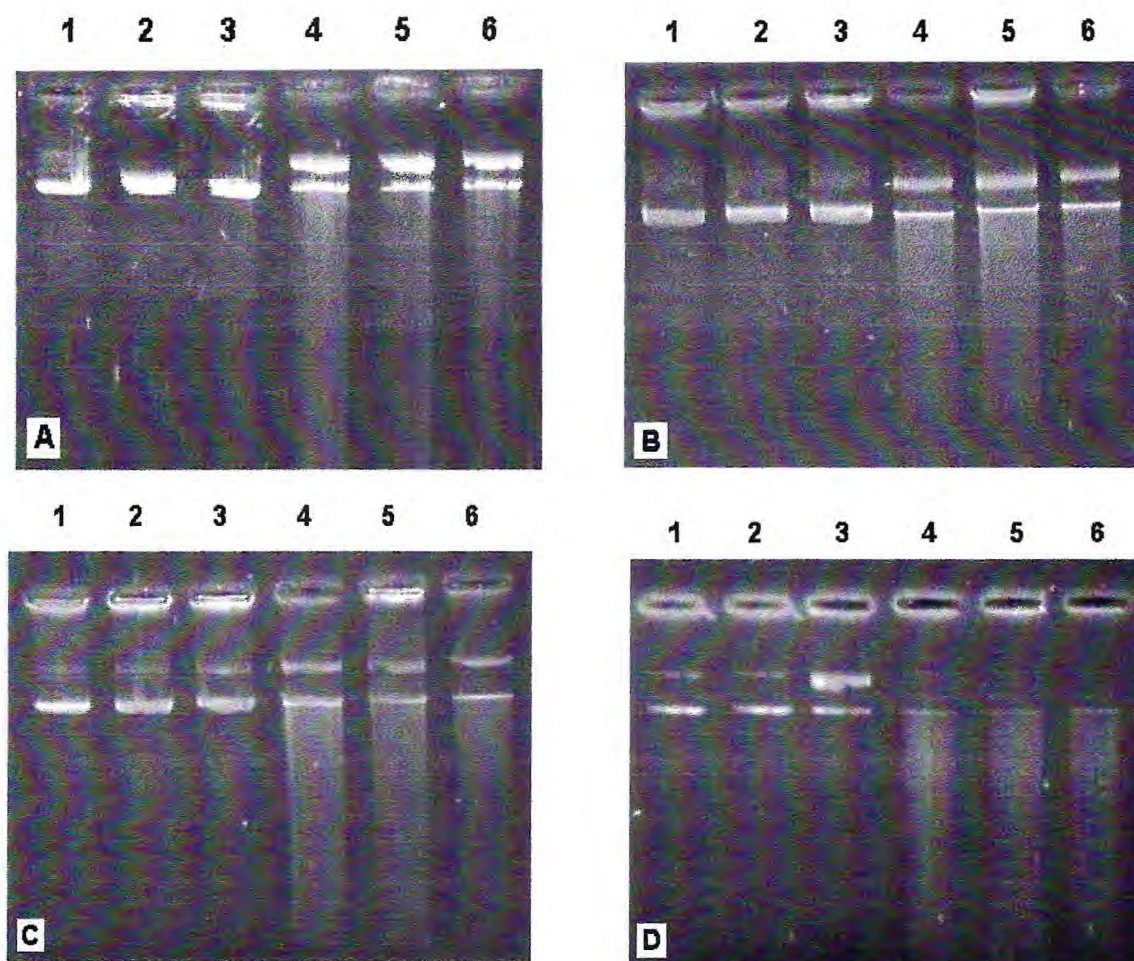


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose para detectar os efeitos do MgCl_2 e do EDTA sobre a atividade desoxirribonucleásica da enzima purificada de cotilédones (FG_{50}), em quatro tempos de reação: 1 (A), 2 (B), 4 (C) e 18 h (D), sendo usado como substrato o DNA circular. Foram usados três controles: poço 1 (DNA incubado sem a enzima); poço 2 (DNA + MgCl_2 incubados sem a enzima) e poço 3 (DNA + EDTA incubados sem a enzima). Nos poços 4, 5 e 6 a enzima foi incubada com DNA, com DNA + MgCl_2 e com DNA + EDTA, respectivamente. Em cada poço foram aplicados 4 μg de DNA.

tempo de reação (1 h) foi observada pequena degradação do DNA quando o mesmo foi incubado com a enzima em ausência ou presença de $MgCl_2$ e EDTA (poços 4, 5 e 6). Nos tempos de reação de 2 e 4 h (Figuras 23B e 23C), a degradação do DNA tornou-se mais evidente, bem como o efeito inibitório do EDTA, não sendo, contudo, detectado efeito algum do $MgCl_2$ sobre a atividade desoxirribonucleásica da fração F_{G50} . Com 18 h de reação, o DNA circular foi fortemente degradado por esta fração, enquanto que o DNA nos controles não sofreu nenhuma degradação. Com este tempo de reação não foram detectadas diferenças entre as hidrólises enzimáticas do DNA em ausência ou presença de $MgCl_2$ e EDTA na mistura de reação.

5. DISCUSSÃO

A salinidade, além de reduzir o crescimento das plântulas também retardou seu desenvolvimento (Figuras 2, 3 e 4). Tais resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores (Maas & Hoffman, 1977; Lacerda, 1995; Sudério, 2001; Sousa *et al.*, 2003). Por outro lado, os dados de matéria fresca dos cotilédones de plântulas submetidas à salinidade apresentaram-se com valores mais elevados que aqueles sob condições controle (Figura 5), sugerindo que o estresse inibiu a mobilização das reservas cotiledonárias para as outras partes da plântula (Prisco, 1987; Prisco *et al.*, 1981; Gomes-Filho *et al.*, 1983), o que parece ser confirmado pelos valores de concentração de proteína nos extratos brutos de cotilédones, durante a fase de estabelecimento das plântulas (Figura 6).

O estudo dos efeitos da salinidade sobre a atividade ribonucleásica (Figura 7) mostrou que a atividade específica foi crescente do 1º ao 7º dia após a semeadura, tanto em condições controle como de estresse salino, porém, a salinidade reduziu fortemente esta atividade (Figura 7A). Fato semelhante foi observado em relação à atividade ribonucleásica total (Figura 7B), porém nesse caso houve redução da atividade após o 3º dia e o efeito da salinidade pode ser interpretado mais como um retardamento do que propriamente como uma inibição nesta atividade. Tais resultados foram concordantes com os observados por Gomes Filho *et al.* (1983), sobre esta mesma enzima de *Vigna unguiculata*. É possível supor-se que o efeito inibitório do NaCl, *in vivo*, na atividade ribonucleásica, pode ter contribuído, pelo menos em parte, para a inibição no crescimento, pois em paralelo a esta inibição, simultaneamente ocorre uma inibição na mobilização do RNA cotiledonário (Gomes Filho *et al.*, 1983). Como consequência disso, há uma menor translocação de nucleotídeos para o eixo embrionário,

possivelmente, limitando a síntese de novos RNAs e prejudicando o processo de síntese protéica.

Após precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio, seguido de sucessivas purificações em colunas cromatográficas de CM-Celulose, DEAE-Sephadex A-25 e Sephadex G-50 (Figuras 8, 9 e 10), conforme metodologia desenvolvida por Gomes-Filho *et al.* (1999), obteve-se um grau de purificação da enzima (F_{G50}) de 384 vezes (Tabela 1), com a mesma apresentando-se como uma única banda protéica, com massa molecular de 16,3 kDa, quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (Figura 11). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Gomes Filho *et al.* (1999), e demonstram o alto grau de pureza com que esta enzima foi obtida no presente estudo.

Através de técnicas imunoquímicas, estudou-se o mecanismo de aumento de atividade da ribonuclease cotiledonária durante a germinação e estabelecimento da plântula, ou seja, procurou-se esclarecer se tal aumento devia-se à síntese *de novo* ou a uma ativação da enzima pré-existente na semente quiescente numa forma inativa ou de baixa atividade. Para maior garantia da especificidade dos anticorpos contra a RNase, os camundongos foram imunizados com a banda protéica correspondente à fração F_{G50} , extraída do gel de poliacrilamida após eletroforese em presença de SDS. Os testes de ELISA, realizados com o soro de camundongos imunizados (Figura 12), indicaram claramente a presença de RNase nos cotilédones de sementes quiescentes e em quantidade que se manteve praticamente a mesma nos cotilédones de plântulas com até três dias após a semeadura em água destilada ou em solução de NaCl 0,1 M. Este resultado, juntamente com aquele mostrado na Figura 7, no qual a atividade ribonucleásica mostrou-se crescente durante os primeiros dias após a semeadura, demonstram que a RNase pré-existe na semente quiescente numa forma inativa (ou de muito baixa

atividade) e que a mesma é ativada e não sintetizada *de novo*. Portanto, os resultados demonstraram que o estresse salino inibiu ou retardou a ativação dessa enzima, pois, como foi mostrado, esse estresse inibiu ou retardou a atividade ribonucleásica durante a fase de germinação e estabelecimento da plântula (Figura 7). Embora os resultados tenham demonstrado que a salinidade não tem efeito sobre a síntese *de novo* da RNase cotiledonária, não se pode excluir a possibilidade que a mesma iniba ou retarda a síntese *de novo* de uma possível enzima envolvida com sua ativação, pois como observado por Gomes Filho & Sodek (1988), a atividade da RNase foi fortemente inibida por cicloeximida, um conhecido inibidor da síntese protéica, durante os primeiros estádios de desenvolvimento das plântulas de *Vigna unguiculata*. O fato dos ΔA_{492} nos testes de ELISA terem se apresentado com menores valores nos 5º e 7º dias após a semeadura em água destilada (Figura 12), sugere que a RNase, juntamente com outras reservas protéicas dos cotilédones (Figura 6), foram, em parte, mobilizadas. Este fato reforça mais ainda a idéia de que a RNase é ativada e não sintetizada *de novo* durante a fase de estabelecimento da plântula, pois mesmo em baixas quantidades, seus níveis de atividade ainda foram relativamente elevados nesses dois dias após a semeadura. O fato de no 5º dia após a semeadura, o ΔA_{492} dos cotilédones estressados terem sido superiores aos do controle sugere que a salinidade inibe ou retarda a mobilização das reservas nesses órgãos.

Também, através do teste de ELISA, os resultados observados comprovaram a presença em extratos de raízes, caules e folhas (Figura 13) de RNases imunologicamente idênticas àquela dos cotilédones. É importante ressaltar, no entanto, que os valores de ΔA_{492} observados neste teste, bem como naquele apresentado na Figura 12, foram relativamente baixos, tendo sido necessário para obterem-se valores de absorbâncias significativos, diluições

de apenas 1:5, o que contrasta com o uso de outras proteínas como antígenos, como foi o caso de Guedes (1999). Esta autora, trabalhando com camundongos imunizados com o vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV) obteve títulos de anticorpos que permitiram diluições de 1:400, nos testes de ELISA. Portanto, grande parte das dificuldades aqui surgidas nos testes de ELISA, deveu-se à limitação na quantidade dos soros imunes, dada as baixas diluições em que os mesmos eram utilizados, associada ao baixo rendimento com que a fração F_{G50} era obtida (resultado não apresentado), limitando conseqüentemente a imunização de um maior número de animais.

Os resultados das reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA) apresentados na Figura 14 indicaram claramente a presença de anticorpos contra a RNase no soro imune, tanto quando a reação foi desencadeada com a fração purificada com sulfato de amônio (F_{45-75}) provenientes de cotilédones, como naquelas oriundas de outras partes da plântula (raízes, caules e folhas). Este resultado, embora qualitativo, confirmou aqueles obtidos pelo teste de ELISA e demonstram a existência de RNase nas outras partes da plântula com respostas imunoquímicas idênticas àquelas da RNase cotiledonária.

A fração mais purificada da RNase cotiledonária (F_{G50}) que foi submetida a eletroforese em condições não desnaturantes, para detecção de isoenzimas, apresentou, no mínimo, duas bandas com velocidades de migração muito próximas entre si (Figura 15). Este fato indica que a RNase cotiledonária isolada num elevado grau de pureza representa, na realidade, pelo menos duas isoenzimas com iguais massas moleculares, resultado concordante com aquele observado por Gomes Filho *et al.* (1999) nesta mesma espécie. Utilizando frações parcialmente purificadas da RNase (F_{CM}) de raízes, caules e folhas, foram detectadas no gel de poliacrilamida duas isoenzimas de RNase, com velocidades de migração iguais aquelas

observadas para a fração F_{G50} (Figura 15). Este resultado, juntamente com aqueles dos testes de ELISA e de PCA, sugerem fortemente que essas duas isoenzimas de RNase são idênticas àquela dos cotilédones. Tais resultados, também foram concordantes com aqueles observados por Franco *et al.* (2001), que mostraram que as RNases parcialmente purificadas de raízes, caules, folhas e cotilédones apresentavam propriedades físico-químicas semelhantes. Em extratos brutos, tanto de cotilédones (Gomes-Filho & Sodek, 1988) quanto de raízes, caules e folhas de *Vigna unguiculata* (Gomes-Filho & Enéas-Filho, 1991) foram detectadas, por eletroforese em gel de poliacrilamida, outras isoenzimas de RNases. Eletroforese para detecção de RNase, feitas com as frações F_{45-75} aqui obtidas, mostraram a presença de várias isoenzimas de RNase, que depois de extraídas do gel de poliacrilamida e terem suas atividades determinadas, apresentaram atividade ribonucleásica que, no total, representaram apenas cerca de 6% daquela correspondente às duas isoenzimas mostradas na Figura 15 (resultados não apresentados). É provável, portanto, que essas últimas sejam as principais responsáveis pelas respostas imunoquímicas observada nos testes de ELISA e PCA, e que elas estejam presentes nas diversas partes da plântula de feijão-de-corda aqui estudadas. Resultados, também não apresentados, corroboram com esta idéia, pois essas duas isoenzimas de RNase que em extratos de sementes quiescente não são detectadas no gel de poliacrilamida, têm progressivamente suas atividades aumentadas em extratos de cotilédones de plântulas com 1, 3, 5 e 7 dias após a semeadura, apresentando, portanto, cinética de atividade semelhante àquela da atividade ribonucleásica específica mostrada na Figura 7A.

A capacidade das frações F_{45-75} e F_{CM} das diversas partes da plântula de hidrolisarem o DNA, determinada por meio das leituras de absorbância em 260 nm (A_{260}) de seus produtos, revelaram pequena atividade desoxirribonucleásica nas frações F_{45-75} e apenas traços desta

atividade nas F_{CM} , isto em condições onde a atividade ribonucleásica foi elevada (Tabela 2). Esses resultados sugerem, portanto, a existência nas frações F_{CM} de apenas RNases (específicas apenas para RNA), e nas frações F_{45-75} a presença de RNases misturadas com nucleases (específicas para DNA e RNA) e/ou com DNases (específicas apenas para DNA), conforme classificação dessas enzimas por Wilson (1975 e 1982). A hipótese da presença de nucleases nestas últimas frações é reforçada pelo fato de que suas atividades desoxirribonucleásicas foram inibidas por EDTA (Tabela 3), o que, segundo Green (1994), é uma característica destas enzimas, mas não das RNases.

O fato de não se ter observado atividade desoxirribonucleásica nas frações F_{CM} , por meio de leituras de A_{260} dos produtos de hidrólise, não exclui a possibilidade destas frações terem tal atividade. É possível, por exemplo, que a limitada concentração da(s) enzima(s) presente nas amostras tenha hidrolisado o DNA, porém em níveis tão baixos que seus produtos não puderam ser detectados espectrofotometricamente. Dado o baixo rendimento na obtenção dessas frações (resultados não apresentados) e, portanto, com a dificuldade de usá-las em concentrações mais elevadas nos ensaios, optou-se por trabalhar com uma técnica empregada para detecção de DNA ou de seus produtos de hidrólise por eletroforese em gel de agarose, seguida de coramento com brometo de etídeo, a fim de esclarecer sobre a existência ou não de atividade desoxirribonucleásica nessas frações. Preliminarmente, estabeleceu-se usar essas frações em concentrações contendo atividade ribonucleásica capaz de hidrolisar todo o RNA (na concentração de $0,05 \mu\text{g} \times \mu\text{L}^{-1}$ na mistura de reação) em cerca de 5 a 10 min (Figura 17). A eletroforese mostrada na Figura 18 demonstrou claramente que as frações F_{CM} das diversas partes da plântula tinham atividade desoxirribonucleásica, sendo a fração de caule a mais ativa.

De posse desses dados, realizou-se um estudo cinético das propriedades da atividade desoxirribonucleásica nas frações F_{CM} das diversas partes da plântula, bem como na fração mais purificada da enzima cotiledonária (F_{G50}). Como observado para outras nucleases (Wilson, 1982; Green, 1994; Brown & Ho, 1987; Ho *et al.*, 1998; Desai & Shankar, 2000), a atividade desoxirribonucleásica das frações F_{CM} de raízes e folhas foram inibidas por EDTA (Figura 19). Porém a fração de raízes, diferentemente daquela de folha, e de outras nucleases (Chevrier & Sarhan, 1980) não foi estimulada pelo $MgCl_2$ (Figura 19). O efeito inibitório do EDTA sobre a atividade desoxirribonucleásica não foi claramente evidenciado na F_{CM} de caules, embora o $MgCl_2$ tenha atuado como um ativador. A F_{CM} de cotilédones apresentou características de nucleases, pois foi inibida por EDTA e estimulada por $MgCl_2$, embora na fração F_{G50} tal efeito tenha sido menos evidente (Figura 20).

Os cátions divalentes Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{+2} inibiram fortemente a atividade desoxirribonucleásica da fração F_{G50} , de forma idêntica à observada em relação à atividade ribonucleásica desta mesma fração da RNase (Gomes-Filho *et al.*, 1999), ou em relação à outras nucleases (Pietrzak *et al.*, 1980; Desai & Shankar, 2000). Este fato sugere que alguns grupos na enzima, envolvidos com a catálise do DNA são, possivelmente, os mesmos envolvidos com a hidrólise do RNA. Pode-se supor que a enzima tenha apenas um centro ativo para os dois substratos (DNA e RNA), porém com diferentes afinidades. Para confirmar esta hipótese, a fração F_{G50} foi incubada com DNA contendo concentrações crescentes de RNA na mistura de reação. As eletroforeses da Figura 22 mostram claramente que os dois substratos competiram entre si pelo centro ativo da enzima, demonstrando desta forma que na fração F_{G50} havia, na verdade, uma nuclease. Esses resultados também excluem a possibilidade de existir

nesta fração purificada uma mistura de RNase com uma DNase contaminante, pois se assim o fosse não haveria tal inibição competitiva da atividade desoxirribonucleásica pelo RNA.

Analisou-se, também, a capacidade da fração F_{G50} de hidrolisar o DNA circular, o que foi feito em ausência e presença de EDTA ou $MgCl_2$. Os resultados apresentados (Figura 23), demonstraram que esta fração foi capaz de hidrolisar o DNA e, portanto, de acordo com a classificação de Wilson (1975 e 1982), mostrou tratar-se de uma nuclease I, pois a mesma foi capaz de hidrolisar o DNA no interior de sua cadeia. Esta atividade contra o DNA circular foi inibida por EDTA, fato comentado anteriormente como sendo característica das nucleases, embora tenha se mostrado insensível ao $MgCl_2$.

6. CONCLUSÕES

1. A RNase cotiledonária pré-existe na semente quiescente numa forma inativa (ou de baixa atividade) e é ativada durante a germinação e primeiros estádios de desenvolvimento da plântula de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] cultivar Pitiúba.
2. A salinidade retarda a atividade ribonucleásica cotiledonária durante os primeiros estádios de desenvolvimento porque inibe o processo de ativação da RNase;
3. As RNases de raízes, caules e folhas de plântulas de feijão-de-corda são, do ponto de vista imunológico, idênticas àquela presente nos cotilédones;
4. A RNase cotiledonária foi capaz de hidrolisar tanto o DNA linear como o DNA circular, sendo na realidade uma nuclease ou, especificamente, uma endonuclease. Esta enzima, da mesma forma que outras nucleases, teve sua atividade desoxirribonucleásica inibida por EDTA, Cu^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} e foi estimulada por MgCl_2 .
5. Concentrações crescentes de RNA na mistura de reação inibiram a atividade desoxirribonucleásica, sugerindo que este substrato compete com o DNA pelo mesmo centro ativo da enzima. Portanto, a RNase isolada de cotilédones de feijão-de-corda, numa forma altamente purificada, é na realidade uma nuclease que apresenta afinidade pelo RNA muito maior que pelo DNA.

7. LITERATURA CITADA

AMZALLAG, G.N.; LERNER, R. Physiological adaptation of plants to environmental stress. *In*: Pessarakli, M. (ed.). **Handbook of Plant and Crop Physiology**. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 557-576, 1995.

APSE, M.P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Cur. Opin. Biotech.**, **13**: 146-150, 2002.

APSE, M.P.; AHARON, G.S.; SNEDDEN, W.A.; BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, **285**: 1256-1258, 1999.

ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA/CNPAF. 1988. 722 p.

ASHRAF, M. Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. **Biol. Plant.**, **26**: 255-259, 1994.

BARKLA, B.J.; PANTOJA, O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **47**: 159-184, 1996.

BARKER, G.R.; BRAY, C.M.; WALTER, T.J. The development of ribonuclease and acid phosphatase during germination of *Pisum arvense*. **Biochem. J.**, **142**: 211-219, 1974.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, v. 2, 1984. 443 p.

BENNETT, P.A.; CHRISPEELS, M.J. *De novo* synthesis of ribonuclease and 1, 3-glucanase by aleurone cells of barley. **Plant Physiol.**, **49**: 445-447, 1972.

BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Cur. Opin. Cell Biol.**, **12**: 431-434, 2000.

BOHNERT, H.J.; SHEVELEVA, E. Plants stress adaptations: making metabolism move. **Cur. Opin. Biotech.**, **1**: 267-274, 1998.

BOHNERT, H.J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Sci. Hortic.**, **78**: 237-260, 1999.

- BRADFORD, M.M. 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, 1976.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. 3^a ed. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, v. 42, 1976. 540 p.
- BRESLER, E.; McNEAL, B.L.; CARTER, D.L. **Saline and Sodic Soils, Principles-Dynamics-Modeling**. New York: Springer-Verlag, 1982. 236 p.
- BROWN, P.H.; HO, T.H. Biochemical properties and hormonal regulation of barley nuclease. **Eur. J. Biochem.** **168**: 357-364, 1987.
- BRYANT, J.A.; GREENWAY, S.C.; WEST, G.A. Development of nuclease activity in cotyledons of *Pisum sativum* L. **Planta**, **130**: 137-140, 1976.
- CHAKRAVORTY, A.K.; SHAW, M. & SCRUBB, L.A. Ribonuclease activity of wheat leaves and rust infection. **Nature**, **247**: 577-580, 1974.
- CHEVRIER, N.; SARHAN, F. Partial purification and characterization of two RNases and one nuclease from wheat leaves. **Plant Sci. Lett.**, **19**: 21-31, 1980.
- CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. 2nd ed. Cambridge: Lubrecht & Cramer Ltd., 1988. 555 p.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **121**: 404-427, 1964.
- DESAI, N.A.; SHANKAR, V. Purification and characterization of the single-strand-specific and guanylic-acid-preferential deoxyribonuclease activity of the extracellular nuclease from *Basidiobolus haptosporus*. **Eur. J. Biochem.**, **267**: 5153-5135, 2000.
- FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>. Acesso em 10/05/2002. 2000.
- FRANCO, O.L.; GONDIM, L.A.G.; BEZERRA, K.R.; GUERRA, M.E.C.; LIMA, C.R.F.M.; ENÉAS-FILHO, J.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Partial purification and characterization of ribonucleases from roots, stem and leaves of cowpea. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, **13**: 358-365, 2001.

- FREIRE-FILHO, F.R. Origem, evolução e domesticação do caupi. *In*: Araújo, J. P. P. & Watt, E. E. (eds.). **O Caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA/CNPAP. p. 27-46, 1988.
- FROMER, W.B.; LUDEWIG, U.; RENTSCH, D. Taking transgenic plants with a pinch of salt. **Science**, **285**: 1222 – 1223, 1999.
- GHEYI, H.R. Problema de salinidade na agricultura irrigada. *In*: Oliveira, T.S., Assis Júnior, R.N., Romero, R.E., Silva, J.R.C. (eds.). **Agricultura, Sustentabilidade e o Semi-Árido**. Fortaleza: DSC/UFC. p. 329-346, 2000.
- GOES, E.S. **Problemas de salinidade e drenagem em projetos de irrigação do nordeste e a ação da pesquisa com vistas a seu equacionamento**. *In*: Reunião sobre Salinidade em Áreas Irrigadas do Nordeste. Fortaleza. 1978, p. 56.
- GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T.; CAMPOS, F.A.P.; ENÉAS-FILHO, J. Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. **Physiol. Plant.**, **59**: 183-188, 1983.
- GOMES-FILHO, E.; SODEK, L. Effect of salinity on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. **J. Plant Physiol.**, **132**:307-311, 1988.
- GOMES-FILHO, E.; ENÉAS-FILHO, J. Atividade ribonucleásica em plântulas de *Vigna unguiculata* Cv pitiúba durante a germinação e estádios iniciais de desenvolvimento. **Revta. brasil. Bot.**, **14**: 45-50, 1991.
- GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T.; ENEAS FILHO, J.; TEIXEIRA, F.S.M.; BEZERRA, J. R.M.V. Properties of a partially purified ribonuclease from cowpea cotyledons. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, **6**: 27-32, 1994.
- GOMES-FILHO, E.; ENEAS-FILHO, J.; PRISCO, J.T. Effects of osmotic stress on growth and ribonuclease activity in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seedlings differing in stress tolerance. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, **8**: 51-57, 1996.
- GOMES FILHO, E.; LIMA, C.R.F.M.; ENÉAS-FILHO, J.; CAMPOS, F.A.P., GONDIM, L.A.; PRISCO, J.T. Purification and properties of a ribonuclease from cowpea cotyledons. **Biol. Plant.**, **42**: 525-532, 1999.
- GOPAL, G.R.; RAO, G.R. Salt effect on *in vivo* activity of nitrate reductase in peanut (*Arachis hypoacea* L.) seedlings. **Turrialba**, **32**: 216-218, 1982.

- GRATTAN, S.R.; GRIEVE, C.M. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. **Sci. Hortic.**, **78**: 127-157, 1999.
- GREEN, P.J. The ribonucleases of higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **45**: 421-445, 1994.
- GREENWAY, H.; OSMOND, C.B. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. **Plant Physiol.**, **49**: 256-259, 1972.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **31**: 149-190, 1980.
- GUEDES, M.I.F. **Resposta imunológica humoral em camundongos imunizados com o "vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV)"**. Fortaleza: UFC, 1999. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal do Ceará, 110 p.
- GUERRIEIRO, JR, V.; DUNHAM, V.L. The presence of a ribonuclease of high molecular weight in sugar beet storage tissue. **Physiol. Plant.** **47**: 15-18, 1979.
- HO, H.C.; SHIAU, P.F.; LIU, F.C.; CHUNG, J.G.; CHEN, L.Y. Purification, characterization and complete amino acid sequence of nuclease C1 from *Cunninghamella echinulata* var. *echinulata*. **Eur. J. Biochem.**, **256**: 112-118, 1998.
- HSIAO, T. C. Ribonuclease activity associated with ribosomes of *Zea mays*. **Plant Physiol.**, **43**: 1355-1361, 1968.
- HURKMAN, W.J.; TANAKA, C.K. The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. **Plant Physiol.**, **83**: 517-524, 1987.
- ISOLA, M.C.; FRANZONI, L. Mechanism of the increase in ribonuclease activity in potato tuber slices. **Plant Cell. Physiol.**, **27**: 331-335, 1986.
- JACOBSEN, H.J. Analysis of RNase isozyme in germinating pea cotyledons by polyacrylamide-gel electrophoresis. **Plant Cell Physiol.**, **21**: 659-665, 1980.
- KESSLER, B.; ENGELBERG, N. Ribonucleic acid and ribonuclease activity in developing leaves. **Biochim. Biophys. Acta**, **55**: 70-82, 1962.

- LACERDA, C.F. **Efeitos da salinidade no desenvolvimento e composição mineral do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e utilização do Ca^{2+} como meio para minorar tais efeitos.** Fortaleza: UFC, 1995. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, 87 p.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, **227**: 680-685, 1970.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal.** São Carlos: Editora Rima Arts e Textos, 2000. 531 p.
- LAUCHLI, A.; EPSTEIN, E. Mechanism of salt tolerance in plants. **Calif. Agric.**, **36**:18-20, 1984.
- LEVITT, J. **Responses of Plants to Environmental Stresses: Water, Radiation, Salt, and Other Stress.** 2nd ed. New York: Academic Press, v. 2, 1980, 606 p.
- LIU, J.; ZHU, J.-K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, **114**: 591-596, 1997.
- MAAS, E.V.; HOFMANN, G.J. Crop salt tolerance-current assessment. **ASCE J. Irrig. Drain. Div.**, **103**: 115-134, 1977.
- MAY, P.H.; TEIXEIRA, S.M.; SANTANA, A.G. Cowpea production and economic importance in Brazil. In: E.E. Watt & J.P.P. Araújo (Eds.). **Cowpea Research in Brazil.** Ibadan: IITA/EMBRAPA., p. 31-62, 1988.
- McKERSIE, B.D.; LESHEM, Y.A. **Stress and Stress Coping in Cultivated Plants.** London: Kluwer Academic Publisher, 1994. 256 p.
- MOONS, A.; BAUW, G.; PRINSEN, E.; MONTAGU, M.V.; STRAETEN, D.V.D. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant *Indica* rice varieties. **Plant Physiol.**, **107**: 177-186, 1995.
- MOTA, I.; WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse anti-sera during the course of immunization. **Life Sci.**, **8**: 813-820, 1969.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell Environ.**, **25**: 239-250, 2002.

- NIU, X.; BRESSAN, R.A.; R.A.; HASEGAWA, P.M.; PARDO, J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiol.**, **109**: 735-742. 1995.
- NIU, D.K.; WANG, M.G.; WANG, Y.F. Plant cellular osmotica. **Acta Biotheoretica**, **45**: 161-169, 1997.
- O'LEARY, J.W. Adaptive components of tolerance. *In*: Pessaraki, M. (ed.). **Handbook of Plant and Crop Physiology**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 577-585, 1995.
- OLIVEIRA, M. **Gênese, classificação e extensão dos solos afetados por sais**. In: Simpósio "Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada. UFPB, Campina Grande, PB, Brasil, p. 3-35, 1997.
- OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **J. Immunol.**, **81**: 355-358, 1952.
- PIETRZAK, M.; CUDNY, H.; MALUSZYNSKI, M. Purification and properties of two ribonucleases and a nuclease from barley seeds. **Biochim. Biophys. Acta**, **614** :102-112, 1980.
- POLJAKOFF-MAYBER, A.; LERNER, H. R. Plants in saline environments. In: Pessaraki, M. (ed). **Handbook of Plant Stress**. New York: Marcel Dekker, 1994.
- PORATH, E.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Effect of salinity in the growth medium on carbohydrate metabolism in pea root tips. **Plant Cell Physiol.**, **9**: 195-203, 1968.
- PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. **Revta brasil. Bot.**, **3**: 85-94, 1980.
- PRISCO, J.T. **Contribuição ao estudo da fisiologia do estresse salino durante a germinação e estabelecimento da plântula de uma glicófita (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Fortaleza: UFC, 1987. Originalmente apresentada como tese para Professor Titular de Fisiologia Vegetal. Universidade Federal do Ceará. 65 p.
- PRISCO, J.T.; O'LEARY, J.W. Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Turrialba**, **20**: 177-184, 1970.
- PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; ENÉAS-FILHO, E. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp seeds. **Revta. brasil. Bot.**; **4**: 63-71, 1981.

- RAMAGOPAL, S. Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 94-98, 1987.
- RAMANI, S.; APTE, S. K. Transient expression of multiple genes in salinity-stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Bura Rata. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** **233**: 663-667, 1997.
- RICHARDS, L.A. **Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils**. U.S.D.A. Agric. Handbook 60. USA. 1954, 160 p.
- RODHES, D.; HANSON, A.D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.**, **44**: 357-384, 1993.
- SABEHAT, A.; WEISS, D.; LURIE, S. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. **Physiol. Plant.**, **103**: 437-441, 1998.
- SACHER, J.A.; MORGAN, E.J.; DE LAROSA, D. Paradoxical effect of actinomycin D. Regulation of synthesis of wound RNase at translation in turnip tissue. **Plant Physiol.**, **56**: 442-449, 1975.
- SAKAMOTO, A.; MURATA, N. The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. **Plant Physiol.**, **125**: 180-188, 2001.
- SALEKDEH, Gh.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. **Field Crops Res.**, **76**: 199-219, 2002a.
- SALEKDEH, Gh.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, **2**: 1131-1145, 2002b.
- SALES, M.G.; RODRIGUES, M.A.C. Consumo, qualidade nutricional e métodos de preparo do Caupi. *In*: Watt, E.E. & Araújo, J.P.P. (eds). **O Caupi no Brasil**. Ibadan: EMBRAPA/IITA, p. 697-722, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Book 2, 1989.

SENA, A.E.S.; BISERRA, J.V. Eficiências e economicidade da irrigação por aspersão na cultura do feijão-de-corda *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Produção Científica do PDCT/NE no Ceará, 2: 588-605, 1991.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant Cell Env.**, 25: 333-341, 2002.

SERRANO, R. Salt tolerance in plants and microorganism: toxicity targets and defense responses. **Int. Rev. Cytol.**, 165: 1-52, 1996.

SERRANO, R. & GAXIOLA, R. Microbial models and salt stress tolerance in plants. **Crit. Rev. Plant. Sci.**, 13: 121-138, 1994.

SHANNON, M.C. The effects of salinity on cellular and biochemical processes associated with salt tolerance in tropical plants. *In*: Davenport, T. L. & Harrington, H. M. (eds.). **Proceedings in Plant Stress in the Tropical Environment**. Kailu-Kona: University of Florida, p. 56-63, 1992.

SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M.; FRANÇOIS, L. E. Whole-plant response to salinity. *In*: Wilkinson, R. E. (ed.). **Plant Environmental Interactions**. New York: Marcel Dekker, p. 199-244, 1994.

SHEORAN, I.S.; GARG, O.P. Effect of salinity on the activities of RNase, DNase and protease during germination and early seedling growth of mung bean. **Physiol. Plant.**, 44:171-174, 1978.

SINDERALOVA, M.; SINDELAR, L.; BURKETOVA, L. Correlation between activity of ribonucleases and potato virus Y biosynthesis in tobacco plants. **Phyiol. Molec. Plant. Phath.**, 57: 191-199, 2000.

SINGH, S.H.; RACHIE, K.O. **Condea Research, Production and Utilization**. Chichester: John Willey & Sons, 1985. 373 p.

SINGH, B.B.; MOHAM RAJ, D.R.; DASHIELL, K.; JACKAI, L.E.N. **Advances in Cowpea Research**. Co. Publication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS). Ibadan, Nigéria, 1997. 373 p.

SOUSA, M.F.; CAMPOS, F.A.P.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E. Growth and protein pattern in cowpea seedlings subjected to salinity. **Biol. Plant.**, 47: 341-346, 2003.

STROGONOV, B.P. **Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants**. Traduzido do Russo por A. Poljakoff-Mayber & A.M. Mayer. Israel Program for Scientific Translations Ltd., 1964. 279 p.

SUDÉRIO, F.B. **Efeito do NaCl na atividade galactosidásica de caules de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Pitiúba**. Fortaleza, CE: UFC, 2001. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, 66p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2002. 690 p.

VERDOLIN, B.A.; FICKER, S.M.; FARIA, A.C.M.; VAZ, N.M.; CARVALHO, C.R. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34: 211-219, 2001.

TROSSATT, C.; RATHINASABAPATHI, B.; WERETILNYK, A.; SHEN, T.; HUANG, Z.; GAGE, D.A.; HANSON, A.D. Salinity promotes accumulation of 3-dimethylsulfoniopropionate and its precursor *S*-Methylmethionine in chloroplasts. **Plant Physiol.**, 116: 165 – 171, 1998.

TUVE, T.W.; ANFINSEN, C.B. Preparation and properties of spinach ribonuclease. **Sov. Plant. Physiol.**, 23: 882-889, 1960.

TVORUS, E. K. Plant ribonucleases. **Soviet. Plant Physiol.**, 23: 882-889, 1976.

TYERMAN, S.D.; SKERRETT, I.M. Root ion channels and salinity. **Sci. Hortic.**, 78: 175 – 235, 1999.

VIEIRA DA SILVA, J.B. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse dans le genre *Gossypium*. II. La variation de quelques activités enzymatiques. **Physiol. Vegetale** 8:413-447, 1970.

WILSON, C.M. A rapid staining technique for detection for RNase after polyacrylamide gel electrophoresis. **Anal. Biochem.** 31: 506-511. 1969.

- WILSON, C.M. Polyacrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. **Plant. Physiol.**, **48**: 64-68, 1971.
- WILSON, C. M. Plant nuclease. **Ann. Rev. Plant. Physiol.** **26**:187-208, 1975.
- WILSON, C.M. Plant nucleases. V. Survey of corn ribonuclease II isoenzymes. **Plant Physiol.**, **61**: 861-863, 1978.
- WILSON, C.M. Plant nuclease: Biochemistry and development of multiple molecular forms. *In*: Rattazzi, M. C. (ed). **Isoenzymes: Current Topics in Biological and Medical Research**. New York: Alan R. Liss, v. 5, p. 33-54, 1982.
- YANCEY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, **217**: 1214-1222, 1982.
- ZHANG H-X.; BLUMWALD, E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in but not in fruit. **Nat, Biotech.**, **19**: 765-768, 2001.
- ZHANG, H-X.; HODSON, J.N.; WILLIAMS, J.P.; BLUMWALD, E. Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **22**: 12832-12836, 2001.
- ZHU, J.-K.; HASEGAWA, B.; BRESSAN, R.A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.**, **16**: 253 – 277, 1997.
- ZHU, J-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Sci.**, **6**: 66-71, 2001.