

EFEITOS DA SALINIDADE SOBRE "CALLI" E SUSPENSÕES CELÚLARES  
DE VIGNA UNGUICULATA (L.) WALP CV. PITIÚBA

ROBERTO JOSÉ MARTINS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1983

Esta Dissertação foi submetida como parte dos re-  
quesitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquí-  
mica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encon-  
tra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciên-  
cia, Tecnologia e Humanidades da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é  
permitida, desde que seja feita de conformidade com as nor-  
mas da ética científica.

---

Roberto José Martins

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

---

Aderson de Menezes Aquino  
Orientador da Dissertação

---

Maria da Guia Silva Lima

---

José Tarquínio Prisco

A meus pais

e

a minha esposa e filhos

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aderson de Menezes Aquino, pela orientação e dedicação permanente durante a execução deste trabalho.

Aos Professores Maria da Guia Silva Lima e José Tarquínio Prisco, pela colaboração e sugestões apresentadas durante a realização desta dissertação.

Aos demais Professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Convênio CNPq/UFC - Dessalinização pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal do Pará e a Faculdade de Medicina do Pará pela concessão de licença de afastamento para a realização deste Curso de Mestrado, e aos colegas, em especial aos Professores Luizileno de Roma Amoedo Brasil, Newton Fernando Silva Brasil, José Maria Dias Mescouto e Maria Ruth Brito Barros pela confiança em mim depositada e pelo estímulo que me proporcionaram.

Finalmente, agradeço de modo especial a minha esposa e filhos que com amor e compreensão contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	vii
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	ix
<u>ABREVIACÕES E DEFINIÇÕES</u> .....	x
<u>RESUMO</u> .....	xii
<u>ABSTRACT</u> .....	xiv
1 - <u>INTRODUÇÃO</u> .....	1
1.1 - <u>A Salinidade e a Produção Agrícola</u> .....	1
1.2 - <u>Alternativas para Minorar os Efeitos da Salinidade</u> .....	2
1.3 - <u>Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos da Cultura de Células e Tecidos sob Condições de Salinidade</u> .....	3
1.4 - <u>Objetivos do Presente Trabalho</u> .....	6
2 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> .....	8
2.1 - <u>Meios de Cultura</u> .....	9
2.2 - <u>Condições de Germinação</u> .....	12
2.3 - <u>Indução de "Callus"</u> .....	13
2.4 - <u>Crescimento de "Callus"</u> .....	15

2.5	-	<u>Preparação de Suspensões Celulares</u> .....	15
2.6	-	<u>Plaqueamento das Suspensões Celulares</u> .....	17
2.7	-	<u>Consumo de Oxigênio das Suspensões Celulares.</u>	18
2.8	-	<u>Análise das Frações Microssomais</u> .....	19
3	-	<u>RESULTADOS</u> .....	21
3.1	-	<u>Efeito do NaCl no Crescimento de "Callus"</u> .....	21
3.2	-	<u>Efeito do NaCl na Formação de Colônias</u> .....	21
3.3	-	<u>Efeito do NaCl no Consumo de Oxigênio das</u> <u>Suspensões Celulares</u> .....	29
3.4	-	<u>Efeito do NaCl nas Frações Microssomais</u> ....	29
4	-	<u>DISCUSSÃO</u> .....	40
5	-	<u>CONCLUSÕES</u> .....	44
6	-	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	45
7	-	<u>ANEXOS</u> .....	50

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		Página
1	Plântulas de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba, com 4 dias de idade .....	14
2	"Calli" formados em seções proximais de <u>co</u> tilédones .....	16
3	Efeito do NaCl no crescimento de "calli" de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba ...	23
4	Conjunto de placas mostrando o crescimento de "calli" .....	24
5	Efeito do NaCl na viabilidade de suspensões celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.)Walp cv. pitiúba .....	27
6	Conjunto de placas mostrando o crescimento de colônias .....	28
7	Tracado polarográfico do consumo de <u>oxigê</u> nio de suspensões celulares de <u>Vigna ungui-</u> <u>culata</u> (L.) Walp cv. pitiúba, na ausência de NaCl (controle) e na presença de NaCl 0,8% (m/v) .....	31
8	Tracado polarográfico do consumo de <u>oxigê</u> nio de suspensões celulares de <u>Vigna ungui-</u> <u>culata</u> (L.) Walp cv. pitiúba, na ausência	

	de NaCl (controle) e após 24 horas da adição de NaCl ao meio de cultura .....	32
9	Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de suspensões celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba, na ausência de NaCl (controle) e após 48 horas da adição de NaCl ao meio de cultura .....	33
10	Efeito do NaCl no consumo de oxigênio de suspensões celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba, após 0, 24 e 48 horas de incubação em meio de crescimento de células em suspensão .....	34
11	Perfil de sedimentação da fração microssomal de "calli" de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba, cultivados na ausência de NaCl .....	36
12	Perfil de sedimentação da fração microssomal de "calli" de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba, cultivados em presença de NaCl 0,4% (m/v) .....	37
13	Perfil de sedimentação da fração microssomal de "calli" de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba, cultivados em presença de NaCl 0,8% (m/v) .....	38



LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Efeito do NaCl no crescimento de "callus" de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba .....	22
2	Efeito do NaCl na viabilidade de suspenções celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba .....	26
3	Efeito do NaCl no consumo de oxigênio de suspensões celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp cv. pitiúba .....	30
4	Efeito do NaCl nas frações microssomais de "callus" de <u>Vigna unguiculata</u> Walp cv. pitiúba .....	35

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ANA	Ácido naftaleno acético
CINETINA	Furfurilamino purina
CALLUS	Massa de tecido consistindo principalmente de células parenquimatosas não diferenciadas.
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético.
EXPLANTE	Porção de tecido que irá dar origem a "callus"
PDA	"Potato dextrose agar"
Pf	Peso fresco final
Pi	Peso fresco inicial
Peso Fresco Relativo	Corresponde a diferença entre o peso fresco final e o peso fresco inicial dividido pelo peso fresco inicial $\left( \frac{Pf - Pi}{Pi} \right)$
rpm	Rotações por minuto
Sx	Desvio padrão
TCA	Ácido tricloroacético
TRIS	TRIS (Hidroximetil) aminometano
Unidade de Plaqueamento	É uma célula isolada ou um agregado de 2 ou mais células capaz de

dar origem a uma única colônia após plaquea  
mento e incubação.

Viabilidade É a relação entre a média de colônias forma  
das e a média de unidades de plaqueamento  
por placa.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da fisiologia do estresse salino empregando-se técnicas de culturas de células e tecidos. Foram utilizadas sementes de feijão de corda pitiúba (Vigna unguiculata (L.) Walb) e de seus cotilédones foram induzidos "calli", dos quais foram obtidas suspensões celulares.

Estudou-se inicialmente os efeitos do estresse salino sobre o crescimento de "calli", através da variação do peso fresco dos mesmos. Os resultados mostraram que o estresse salino induziu uma redução exponencial da taxa de crescimento dos "calli", que atingiu aproximadamente 79% do controle quando o nível de sal foi de 0,8% (m/v). Além disso, o NaCl foi aparentemente responsável pelo escurecimento e menor friabilidade dos mesmos.

Estudo sobre a viabilidade celular mostrou que o estresse salino induziu uma redução exponencial, a qual atingiu um valor de  $1 \times 10^{-2}$ , para um nível de NaCl de 0,8% (m/v), enquanto o controle apresentou um valor de  $1 \times 10^{-1}$ . Além disso, a redução da viabilidade foi acompanhada da diminuição das dimensões das colônias formadas, bem como do seu escurecimento, efeitos estes proporcionais à concentração do NaCl.

O efeito do estresse salino sobre o consumo de  $O_2$

de suspensões celulares mostrou que a presença de NaCl induziu uma redução progressiva do consumo de  $O_2$ , que atingiu 50% do controle quando o nível de sal foi de 0,8% (m/v). Foi observado também que o consumo de  $O_2$  não foi alterado imediatamente após adição de NaCl ao meio de reação.

No tocante a análise do perfil ribossomal, o estresse salino induziu uma liberação de ribossomas da região 10, provavelmente ribossomas e polissomas associados às membranas do retículo endoplasmático. Observou-se que esta liberação foi acompanhada de um aumento correspondente das regiões 4, 5, 6, 7, 8 e 9 as quais representam respectivamente, monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros livres. Estes efeitos foram proporcionais às concentrações de sal no meio.

## ABSTRACT

The object of this study was to test the effects of salinity on calli and cellular suspensions of Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitiúba.

The effects of the salt stress on calli growth was studied by determining the variations of their fresh weights. The results showed that salt stress induced an exponential growth reduction of calli that reached approximately 79% of the control when the salt concentration the medium was 0,8% (w/v). Besides this NaCl was apparently responsible for the darkening and decreased friability of the calli. The presence of NaCl induced an exponential reduction in cellular viability wich reached a value of  $1 \times 10^{-2}$  for a NaCl concentration 0.8% (w/v) while the control presented a value of  $1 \times 10^{-1}$ . The reduction in viability was accompanied by the reduction in colony size as well as darkening, and these effects were proportional to the concentration of NaCl added to the medium.

The effect of the salt stress induced a progressive reduction in oxigen consumption by cell suspensions that reached 50% of the control when the salt concentration of the medium was 0.8% (w/v). It was also observed that  $O_2$  consumption of cell suspensions apparently was not altered immediately after the addition of NaCl at the levels examined.

The effect of NaCl in the microsomal fractions of calli showed that the presence of NaCl in the callus inducing medium in explants induced a decrease in fraction 10 probably made up of polysomes and ribosomes associated to the endoplasmic reticulum membranes, accompanied by a corresponding increase of the regions 4, 5, 6, 7, 8 and 9 which represent ribosomes, dimers, trimers, tetramers, pentamers and hexamers respectively free from the endoplasmic reticulum membranes. These effects were directly proportional to the concentration of NaCl added to the callus inducing medium in explants.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - A Salinidade e a Produção Agrícola

Sabe-se que o excesso de sais no solo é prejudicial ao crescimento e produtividade das plantas, trazendo como consequência sérios problemas no aproveitamento dos solos salinizados para a Agricultura. A irrigação é essencial à produção agrícola em regiões áridas e semi-áridas, mas contribui igualmente para o processo de salinização (MARX, 1979), pois nestas regiões observam-se baixas precipitações pluviométricas associadas a elevadas taxas de evaporação. Extensas áreas do globo terrestre encontram-se nesta situação. Estimativas recentes indicam a existência de pelo menos 4 milhões de km<sup>2</sup> de solos salinizados na superfície terrestre, excluindo a área dos grandes desertos (FLOWERS et al. 1977). Nos Estados Unidos, a salinidade do solo reduz em mais de 25% a produção de suas áreas irrigadas (BLACK, 1968). No Brasil, o problema se apresenta de forma mais grave na região Nordeste, onde estima-se que 25% da área irrigada está salinizada (GOES, 1977).

A instalação de novos projetos de irrigação na região Nordeste, associada ao manejo inadequado do solo e da água provocaram aumento das áreas salinizadas, com conse



quentes efeitos negativos sobre a produção agrícola.

### 1.2 - Alternativas para Minorar os Efeitos da Salinidade

Teoricamente existem 3 alternativas para minorar os problemas resultantes da salinização dos solos (PRISCO, 1980):

- 1) recuperação dos solos afetados pela salinidade, através de métodos físicos e químicos;
- 2) modificações no ambiente em que as plantas são cultivadas, e
- 3) aumento da tolerância das culturas à salinidade.

A primeira alternativa apesar de ser tecnicamente viável, envolve grandes investimentos, sendo na maioria dos casos, inexecutável do ponto de vista econômico. Com relação a segunda, pode-se modificar o ambiente radicular, através de técnicas de irrigação que mantenham a umidade do solo na zona das raízes próxima à capacidade de campo. Para a consecução da última alternativa existem pelo menos duas maneiras para solucionar o problema:

- 1) selecionar, através de melhoramento genético clássico, cultivares mais resistentes à salinidade;
- 2) selecionar, através das técnicas de cultura de células e tecidos, cultivares mais resistentes

ao excesso de sais.

### 1.3 - Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos da Cultura de Células e Tecidos sob Condições de Salinidade

De acôrdo com o princípio da totipotência (STEWART, 1963) toda célula vegetal tem capacidade de produzir uma nova planta desde que lhe sejam propiciadas condições nutricionais e ambientais (físicas e reguladoras do crescimento) apropriadas. Baseados neste princípio os fitotecnistas desenvolveram técnicas de propagação de plantas a partir de células de "calli" ou tecidos vegetais. Além disso, este método tem sido utilizado no melhoramento vegetal, tendo como objetivo a seleção de mutantes com características genéticas desejáveis (CARLSON, 1973; WIDHOLM, 1974; CHALLEF & PARSONS, 1978; NABORS et al. 1980)./

O objetivo principal das pesquisas se concentra na produção de plantas tolerantes às condições adversas do meio. Para isso, suspensões celulares são inoculadas em um meio de cultura e expostas ao agente seletivo. Gradualmente, os mutantes presentes na suspensão celular são selecionados. Em alguns casos estas células mutantes podem ser facilmente regeneradas em plantas. Vários mutantes espontâneos e/ou induzidos já foram regenerados em plantas. CARLSON (1973) selecionou mutantes de Nicotiana tabacum, resistentes à sulfoximina de metionina, um análogo tóxico semelhante à metioni

na, produzido pelo Pseudomonas tabaci e regenerou plantas que foram parcialmente resistentes ao Pseudomonas tabaci. WIDHOLM (1974) selecionou células mutantes de Daucus carota resistentes ao 5-metil triptofano e regenerou plantas a partir dessas células que foram resistentes a este inibidor metabólico. CHALLEF & PARSONS (1978) isolaram mutantes de fumo resistentes ao herbicida "picloram" e regeneraram plantas a partir de alguns clones resistentes. NABORS et al. (1980) isolaram mutantes de fumo espontâneos e/ou induzidos resistentes ao NaCl e regeneraram plantas mutantes resistentes ao sal. Observaram também que as plantas regeneradas apresentavam um nível de tolerância superior ao da cultura de células. Apesar do sucesso conseguido pelos autores acima, que utilizaram esta técnica de melhoramento para produção de plantas tolerantes à salinidade, existem outros que podem afirmar que a tolerância à salinidade é uma propriedade do indivíduo como um todo e não de cada uma de suas células (STROGONOV, 1973). Este último baseia-se no fato de que as células de halófitas são tão sensíveis à salinidade quanto as células de glicófitas. Além disso, "calli" selecionados visando a tolerância a sais, quando foram diferenciados em plantas não manifestaram esta característica. Esta aparente discrepância de resultados parece ser devida em grande parte a escassez de conhecimentos básicos sobre a fisiologia das células e tecidos em culturas sob condições de salinidade, indispensáveis ao desenvolvimento de métodos de seleção adequados e de identificação de parâmetros fisiológicos que reflitam o caráter

selecionado à nível celular após o crescimento dos "calli" e regeneração das plantas.

Infelizmente, poucos trabalhos referem a obtenção de mutantes celulares espontâneos de uso potencial na Agricultura (DIX & STREET, 1975; NABORS et al. 1975; CROUGHAM et al. 1978). Contudo, o uso dessas técnicas tem sido de grande valor para estudos dos aspectos fisiológicos e bioquímicos de cultura de células e "calli" sob condições de salinidade. Recentemente CHEN et al. (1980), estudando os efeitos da salinidade sobre "calli" de fumo, observaram que o estresse salino inibia o crescimento destes "calli". Estudos cinéticos de absorção de íons, mostraram um grande acúmulo de íons pelos tecidos durante as primeiras 24 horas de cultura. Foi observado também que o conteúdo de  $\text{Na}^+$  nos "calli" tinha aumentado, enquanto o conteúdo de  $\text{K}^+$  tinha decrescido. Resultados semelhantes foram obtidos por STROGONOV (1973) com "calli" de fumo e sorgo. Mais recentemente, HEISER & NABORS (1981), estudando o ajustamento osmótico de cultura de células de fumo sob condições de salinidade, observaram que além da redução do crescimento, as células acumulavam íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em concentrações idênticas às do meio. Este fato sugere que o acúmulo de íons absorvidos do meio de cultura seja responsável pelos efeitos tóxicos para as células, provocando transtornos metabólicos que iriam afetar o crescimento de células e "calli" em cultura.

Apesar da carência de dados sobre estudos metabólicos em cultura de células e tecidos sob condições de sali

nidade, sabe-se que o metabolismo das plantas é afetado em condições de estresse salino. Existem evidências experimentais de que a salinidade afeta sistemas enzimáticos relacionados ou não com a atividade mitocondrial (FLOWERS & HANSON, 1969; PORATH & POLJAKOFF, 1969; FLOWERS, 1972; KALIR & POLJAKOFF-MAYBER, 1975; REINALDO, 1978). Contudo, esta questão ainda é controvertida (LIVNE & LEVIN, 1967).

Existem poucos registros na literatura com relação aos efeitos da salinidade sobre o sistema ribossomal de plantas. Todavia, YAMAMOTO et al. (1981) submeteram membranas tilacóides de cloroplastos de ervilha a condições de estresse salino e observaram um aumento da quantidade de ribossomas livres (31 - 41% do total) quando comparada à do controle. Este fato sugere que a salinidade afeta seletivamente o sistema ribossomal ligado às membranas com consequente liberação de seus ribossomas.

#### 1.4 - Objetivos do Presente Trabalho

O presente trabalho visou o estudo da fisiologia do estresse salino empregando-se técnicas de cultura de células e tecidos. Foram utilizadas sementes de feijão de cor da pitiúba e de seus cotilédones foram induzidos "calli", dos quais foram obtidas suspensões celulares. A seguir, em presença e na ausência de estresse salino foram estudados:

- a) crescimento de "calli";

- b) formação de colônias;
- c) consumo do oxigênio das suspensões celulares;
- d) perfil ribossomal de "calli".

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas sementes de feijão de corda Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitiúba, fornecidas pelo Banco de Sementes da UFC. As referidas sementes após uma rápida seleção foram acondicionadas em frascos de vidro contendo sílica gel e armazenadas a uma temperatura de aproximadamente 4-8°C.

Foram empregados os reagentes abaixo relacionados com suas respectivas procedências.

- Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EEUU:  
Potato Dextrose Agar (PDA)  
Bacto Agar

- Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland Ohio, EEUU:  
Ácido Naftaleno Acético (ANA)

- Schwartz / Mann, Orangeburg, New York, EEUU:  
Sacarose, tipo Gradiente de Densidade (Livre de Ribonuclease)

- Sigma Chemical Company, Sant Louis, Missouri, EEUU:  
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

Furfurilamino purina (CINETINA)

Vitamina E crist. Tipo IV

Mio - Inositol

- Merck, Darmstadt, Alemanha:

Pantotenato de Cálcio

Vitamina H (D<sup>+</sup> Biotina)

Vitamina B<sub>1</sub> (Dicloreto de Tiamina)

Vitamina B<sub>6</sub> (Cloridrato de Piridoxina)

- Carlo Erba, Brasil:

Ácido Nicotínico

Os demais reagentes foram todos de grau analítico com exceção do Hipoclorito de Sódio que foi obtido sob o nome comercial de Q-Boa (Indústrias Anhembí S.A., Av. Periférica II, Simões Filho - Ba).

## 2.1 - Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados são constituídos de um meio básico, modificado por PHILIPS (1974), de acordo com a citação de OSWALD et al. (1977), acrescidos dos elementos variáveis,



A composição do meio básico é a seguinte:

Constituintes	Concentração
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	12,49 mM
$\text{KNO}_3$	9,89 mM
$\text{Ca} (\text{NO}_3)_2$	2,12 mM
$\text{MgSO}_4$	0,14 mM
$\text{KCl}$	0,87 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,20 mM
$\text{MnSO}_4$	26,03 $\mu\text{M}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	25,87 $\mu\text{M}$
$\text{ZnSO}_4$	5,22 $\mu\text{M}$
$\text{KI}$	4,52 $\mu\text{M}$
$\text{CoCl}_2$	0,15 $\mu\text{M}$
Glicina	26,54 $\mu\text{M}$
Mio - Inositol	0,56 $\mu\text{M}$
Cloridrato de Piridoxina	0,49 $\mu\text{M}$
Dicloreto de Tiamina	0,30 $\mu\text{M}$
Biotina	0,82 $\mu\text{M}$
Ácido Nicotínico	4,06 $\mu\text{M}$
Pantotenato de Cálcio	12,58 $\mu\text{M}$

Meio Indutor de "Callus" em Explantes

Meio básico acrescido de:

FeSO <sub>4</sub>	0,36 mM
EDTA	0,46 mM
ANA	19,59 µM
Cinetina	0,46 µM
Vitamina E	2,12 µM
Sacarose	3% (m/v)
Agar	0,6% (m/v)

Meio de Crescimento de Células em Suspensão

Meio básico acrescido de:

FeSO <sub>4</sub>	0,18 mM
EDTA	0,23 mM
2,4-D	2,26 µM
Cinetina	0,46 µM
Vitamina E	2,12 µM
Sacarose	2% (m/v)

Meio Indutor de "Callus" em Suspensão Celular

Meio básico acrescido de:

FeSO <sub>4</sub>	0,07 mM
EDTA	0,09 mM
2,4-D	2,26 µM
Cinetina	0,46 µM
Sacarose	2% (m/v)
Agar	1% (m/v)

Os estoques de  $\text{FeSO}_4$  foram sempre utilizados imediatamente após a preparação.

Após a dissolução de todos os constituintes cada meio de cultura teve seu pH ajustado para 6,0 com NaOH 0,1M sendo em seguida autoclavado por 15 minutos a  $120^\circ\text{C}$ .

O meio de germinação "Potato Dextrose Agar" (PDA) foi preparado na concentração de 3,9% (m/v).

O meio "Penassay-Agar" foi preparado nas concentrações de 1,75% (m/v) de "Bacto-Penassay Broth" e 1,5% (m/v) de "Bacto Agar".

Os meios PDA e "Penassay-Agar" foram autoclavados por 20 minutos a  $120^\circ\text{C}$ .

A água utilizada para o preparo dos meios de cultura foi destilada e desionizada.

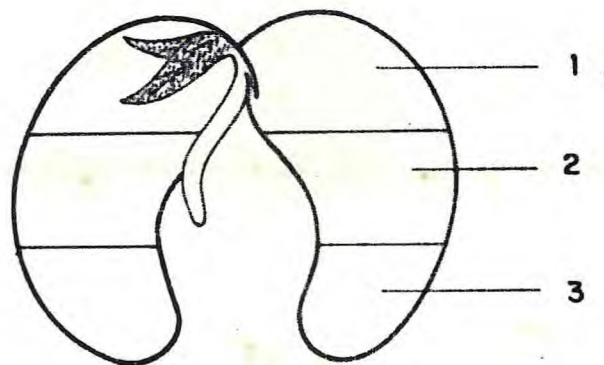
## 2.2 - Condições de Germinação

As membranas após selecionadas de acordo com o tamanho e conformação foram esterilizadas em Álcool Etílico 96° G.L. por 30 segundos e em seguida durante 5 minutos em Hipoclorito de Sódio a 2,5% (m/v) (O-Boa diluída 1:1 com água desionizada estéril). Em seguida as sementes foram lavadas 3 vezes com água desionizada estéril, semeadas assepticamente,

em número de 8 por placa de petri, contendo PDA a 3,9% (m/v) e incubadas no escuro à temperatura de 28 — 30°C durante 4 dias.

### 2.3 - Indução de "Callus"

Após retirado o tegumento das sementes germinadas (FIGURA 1), as mesmas foram cuidadosamente cortadas transversalmente, com auxílio de uma pinça e bisturi estéreis, em 3 seções de aproximadamente as mesmas dimensões, conforme o diagrama abaixo:



Seção 1 = proximal em relação ao eixo embrionário

Seção 2 = mediana em relação ao eixo embrionário

Seção 3 = distal em relação ao eixo embrionário

As porções proximais ao eixo embrionário foram se



FIGURA 1 - Plântulas de Vigna unguiculata (L.) Walp. cv. pitiúba, com 4 dias de idade. As se mentes germinaram em PDA.

meadas assepticamente, em número de 8 por placa de petri, contendo meio indutor de "callus" em exolantes e incubadas no escuro durante 3 semanas à temperatura de 28-30°C. A seção proximal ao eixo embrionário foi escolhida em virtude de ser esta seção a produtora de maiores rendimentos de "callus" das 3 seções referidas. (MATOS BRITO, 1980).

#### 2.4 - Crescimento de "Callus"

Amostras de aproximadamente 0,3g de "callus" formadas em seções proximais de cotilédones após 3 semanas de incubação no escuro em meio indutor de "callus" em explantes, (FIGURA 2), foram transferidas assepticamente para placas de petri, contendo meio indutor de "callus" em explantes acrescido de NaCl nos seguintes níveis percentuais (m/v): 0,0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%. Em seguida, as placas foram incubadas durante 10 dias no escuro à temperatura de 28-30°C.

Para a determinação quantitativa do crescimento dos "calli", foram determinadas as variações de peso fresco dos mesmos através de pesagens antes e depois dos períodos de incubação.

#### 2.5 - Preparação de Suspensões Celulares

"Calli" friáveis formados em seções proximais de cotilédones obtidos após 3 semanas de incubação em meio indutor de "callus" em explantes, foram transferidos para um erlenmeyer de 250ml de capacidade, na proporção de 30 "calli" para 50ml de meio de crescimento de células em suspensão.



FIGURA 2 - "Calli" formados em seções proximais de cotilédones. Os explantes foram incubados em meio indutor de "callus" durante 3 semanas, segundo o descrito em MATERIAL E MÉTODOS.

Em seguida, os frascos foram incubados sob agitação rotativa (120 rpm) à temperatura de 28-30°C e iluminação contínua (3.000 lux). Após um período de 24 horas de agitação as suspensões produzidas foram filtradas em malhas de nylon (250-300 µm de diâmetro), a fim de remover os fragmentos de tecidos somáticos e agregados celulares de mais de 5 células por agregado. Para a contagem de células foram retiradas amostras de 0,5ml das suspensões celulares, e após adição de 0,1ml de TCA 90% (m/v) foram agitadas e deixadas em repouso por 30 minutos (HUBER et al. 1978). Em seguida, determinou-se a densidade celular através de contagem de células em câmara de Neubauer de 0,1 mm de profundidade.

A contaminação por microorganismos foi controlada plaqueando-se alíquotas das suspensões em "Penassay-Agar" e incubando-se a 37°C por 24 horas.

## 2.6 - Plaqueamento das Suspensões Celulares

Para o plaqueamento de suspensões celulares, utilizou-se a técnica de HORSCH & JONES (1980). As suspensões celulares foram obtidas a partir de "calli" de secções cotiledonares proximais como o descrito anteriormente. Alíquotas de 2 ml de suspensões com densidade celular de  $1,2 \times 10^6$  células/ml foram semeadas em placas de petri, contendo meio indutor de "callus" em suspensão celular acres



cido de NaCl nos seguintes níveis percentuais: 0,0; 0,2; 0,4 e 0,8% (m/v).

Posteriormente, as placas foram agitadas até que as células se distribuíssem uniformemente e deixadas em repouso por 2 horas para absorção do excesso de líquido pelo agar. Esta camada de células constituiu a "camada alimentadora". Discos estéreis de papel de filtro qualitativo foram cuidadosamente colocados sobre a camada alimentadora, cobrindo completamente toda a superfície da placa, e sobre este, um segundo disco, de diâmetro 2 cm menor que o primeiro foi superposto. As suspensões para plaqueamento foram preparadas conforme descrito anteriormente e diluídas adequadamente com meio líquido para uma densidade celular de 100 células/ml. Cada célula ou agregado celular foi referido como uma "unidade de plaqueamento". Aliquotas de 1 ml da suspensão celular diluída foram cuidadosamente semeadas exclusivamente sobre o papel de filtro de menor diâmetro, em cada placa. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro a 28 — 30°C por 4 semanas após o que os resultados foram registrados.

## 2.7 - Consumo de Oxigênio de Suspensões Celulares

A atividade respiratória das células em suspensão foi medida pela determinação polarográfica do consumo de

oxigênio em um oxígrafo GILSON, modelo K-1C polarizado a 0,8V com eletrodo de CLARK acoplado à câmara de reação a 26°C. O consumo de oxigênio foi determinado em amostras de 1,5ml cada de suspensão celular (densidade celular  $6,8 \times 10^5$  células/ml) acrescidas de NaCl nos seguintes níveis percentuais: 0,0; 0,2; 0,4 e 0,8% (m/v). As determinações polarográficas do consumo de oxigênio nas suspensões celulares foram realizadas nos tempos: 0, 24 e 48 horas após a adição de NaCl às mesmas. Ao longo de todo o experimento as suspensões celulares foram mantidas a 28-30°C sob agitação rotativa (120 rpm) e iluminação contínua (3.000 lux).

## 2.8 - Análise das Frações Microsossomais

As frações microsossomais analisadas neste experimento foram preparadas a partir de "calli", segundo DAVIES et al. (1972). Foram utilizados "calli", após 10 dias de repicados em meio indutor de "callus" em explantes (controle) e no mesmo meio acrescido de 0,4 e 0,8% de NaCl (m/v). As amostras foram homogeneizadas em um oral de porcelana contendo meio de homogeneização (sacarose 60 mM, KCl 60 mM, Mg Cl<sub>2</sub> 30 mM, Tris 200 mM, pH 8,5) na proporção de 1g de material ("callus") por 10 ml

de meio. O homogenato resultante foi centrifugado por 20 minutos a 20.000 x g. O sobrenadante desta centrifugação (35 ml) foi cuidadosamente colocado sobre uma camada de 15 ml de sacarose 1,5M, Tris-HCl 40mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, KCl 20mM, pH 8,5 em um tubo do rotor A-170 de uma ultracentrífuga "International", modelo B-60 e centrifugado por 120 minutos a 35.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com 1,2 ml de tampão Tris-HCl 40mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, KCl 20mM, pH 8,5 e suspenso em 0,5ml do mesmo tampão. Aliquotas de 0,2ml das frações microssomais foram cuidadosamente adicionadas ao topo de gradientes lineares de sacarose (125-500mg/ml) em tampão Tris-HCl 20mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, KCl 20mM, pH 8,5 e centrifugadas por 75 minutos a 33.000 rpm no rotor SB-283 da mesma ultracentrífuga.

Os gradientes foram preparados a 4°C em tubo de "Polyallumer" do rotor SB-283 adicionando-se inicialmente 2 ml de sacarose (500mg/ml) seguidos de 4 ml de sacarose (375mg/ml), 4 ml de sacarose (250mg/ml), 2 ml de sacarose (125mg/ml) e deixados equilibrar por 48 horas a mesma temperatura. Após a centrifugação dos gradientes os mesmos foram analisados em um fracionador de Gradiente de Densidade Isco modelo 640, monitorizado continuamente a 254 nm. As áreas das diferentes regiões dos perfis de sedimentação das diversas frações microssomais foram em seguida determinadas através de corte e pesagem das mesmas.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Efeitos do NaCl no Crescimento de "Callus"

A TABELA 1 mostra os valores de aumento de peso fresco relativo, isto é, aumento de peso por unidade de peso inicial. Diante destes resultados pode-se afirmar que a adição de NaCl ao meio indutor de "callus" em explante, reduz progressivamente a taxa de crescimento dos "calli". De acordo com a FIGURA 3 a redução de crescimento dos "calli" é do tipo exponencial. Além da redução exponencial da taxa de crescimento dos "calli", os diversos níveis de NaCl acrescidos ao meio indutor de "callus" em explante, foram responsáveis por uma menor friabilidade e pelo escurecimento dos mesmos. Isto se acentuou a medida que aumentou a concentração de NaCl (FIGURA 4).

#### 3.2 - Efeito do NaCl na Formação de Colônias

As células plaqueadas observadas no microscópio

TABELA 1 - Efeito do NaCl no crescimento de "callus" de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitiúba.

NaCl <sup>(1)</sup> (%)	Peso fresco relativo <sup>(2)</sup>	(%) do controle
0,0	0,795 ± 0,026	100,0
0,1	0,571 ± 0,037	76,8
0,2	0,434 ± 0,012	54,5
0,4	0,336 ± 0,022	42,2
0,8	0,196 ± 0,006	21,2

1) O sal foi adicionado ao meio indutor de "callus" em explantes.

2) Os valores representam a média de 15 determinações acompanhada do desvio padrão, que foi calculado de acordo com a expressão:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{(n - 1)}}$$

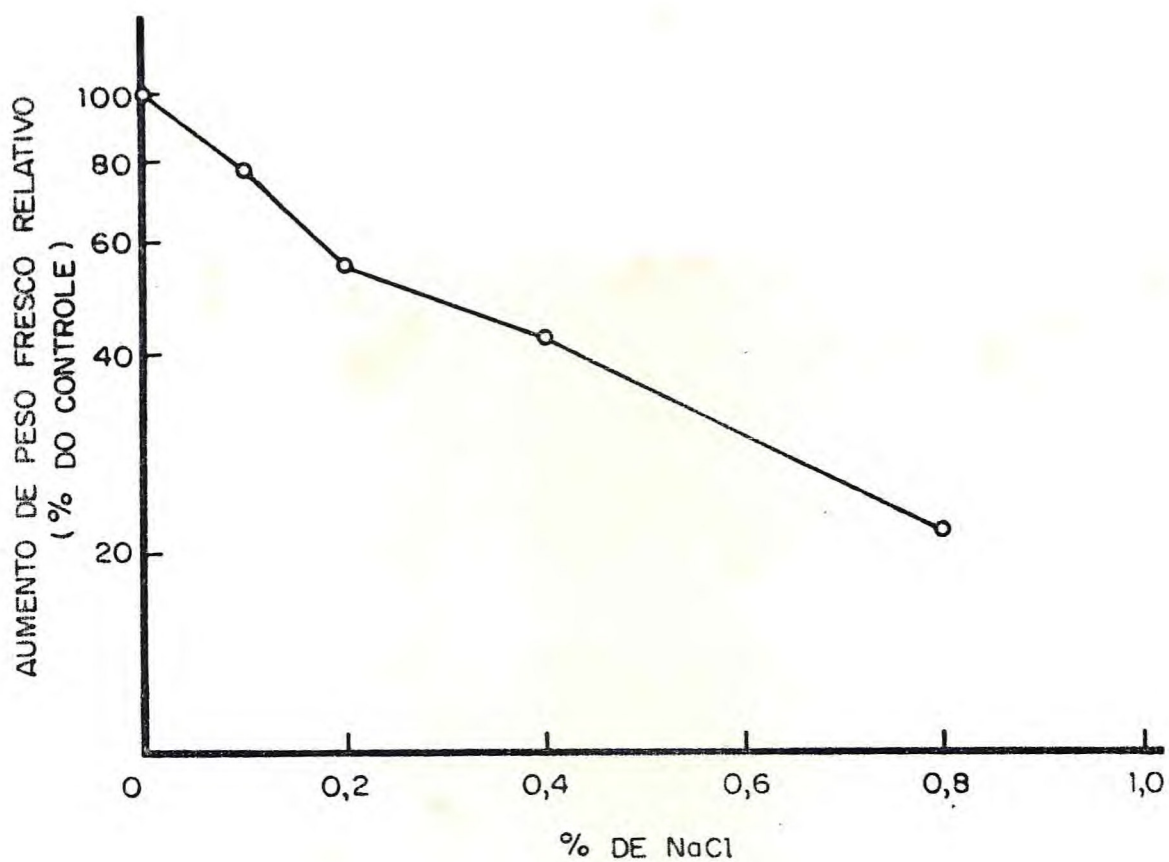


FIGURA 3 - Efeito do NaCl no crescimento de "callus" de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. nitiúba. As condições experimentais estão descritas na legenda da FIGURA 4.

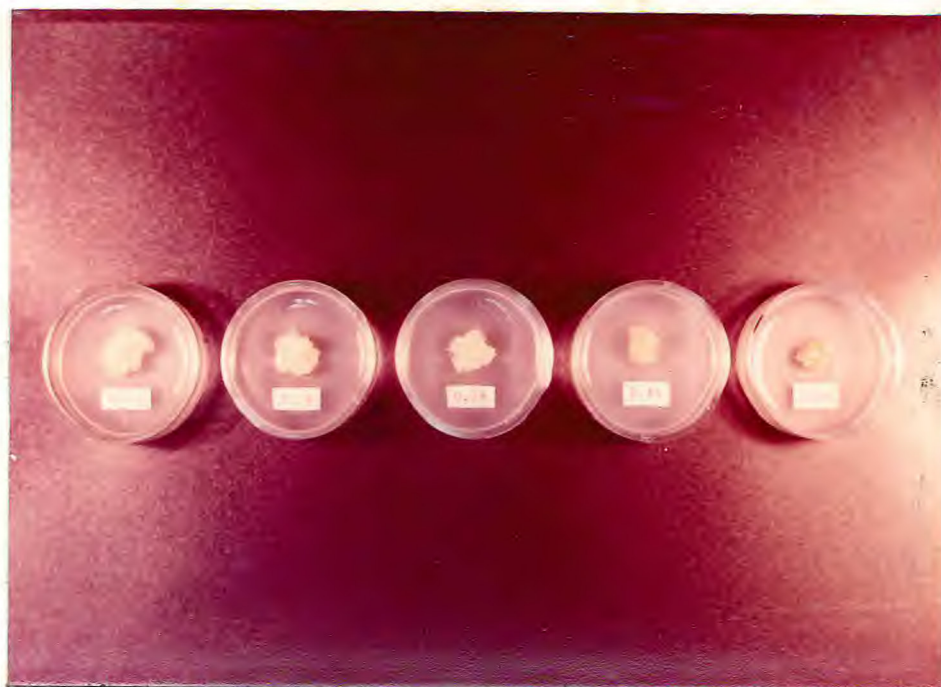


FIGURA 4 - Conjunto de placas, mostrando o crescimento de "calli". Os "calli" foram transferidos para o meio indutor de "callus" em explantes, contendo da esquerda para a direita 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8% de NaCl (m/v). As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.

apresentavam grandes vacúolos e faixas citoplasmáticas. As unidades de plaqueamento eram constituídas, na sua maioria, por células isoladas (64%) e as demais por agregados celulares de duas a dez células por agregado, sendo os agregados maiores tanto menos frequentes quanto maiores o seu número de células. A TABELA 2 mostra os valores de viabilidade das suspensões celulares em meio indutor de "callus" em suspensão celular acrescidos dos diversos níveis de NaCl. Pode-se afirmar que a adição de NaCl ao meio indutor de "callus" em suspensão celular reduz progressivamente a viabilidade das células.

De acordo com a FIGURA 5 a redução de viabilidade observada é do tipo exponencial. Além da redução exponencial da viabilidade celular, os diversos níveis de NaCl foram responsáveis pela redução das dimensões das colônias formadas e pelo escurecimento das mesmas. Isto se acentuou a medida que aumentou a concentração de NaCl (FIGURA 6).



TABELA 2 - Efeito do NaCl na viabilidade de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitíuba.

NaCl <sup>(1)</sup> (%)	Viabilidade
0,0	$1 \times 10^{-1}$
0,2	$6 \times 10^{-2}$
0,4	$4 \times 10^{-2}$
0,8	$1 \times 10^{-2}$

(1) O sal foi adicionado ao meio indutor de "callus" em suspensão celular.

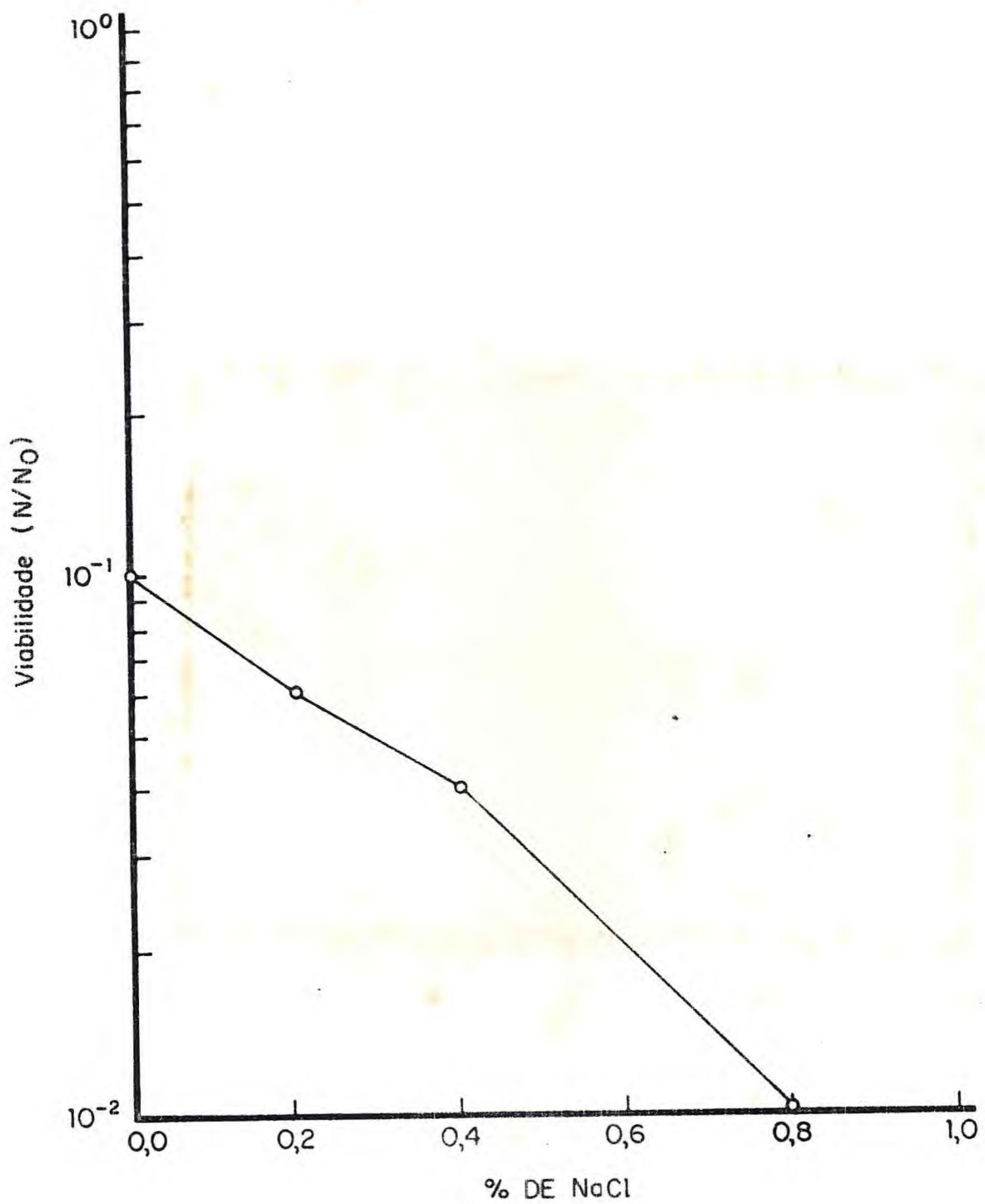


FIGURA 5 - O efeito do NaCl na viabilidade de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pituíba. As condições experimentais estão descritas na legenda da FIGURA 6.



FIGURA 6 - Conjunto de placas, mostrando o crescimento de colônias. As suspensões celulares foram semeadas em meio indutor de "callus" em suspensão celular, contendo os níveis de NaCl acima indicados. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.

### 3.3 - Efeito do NaCl no Consumo de Oxigênio das Suspensões Celulares

A TABELA 3 mostra os valores do consumo de oxigênio após 0, 24 e 48 horas da adição de NaCl, os quais foram calculados a partir das FIGURAS 7, 8 e 9. Pode-se afirmar que quando o consumo de oxigênio foi medido logo após a adição de sal, o mesmo manteve-se inalterado, independente da concentração de sal utilizado. Todavia, quando o consumo de oxigênio foi medido após 24 ou 48 horas da adição do sal ele foi inibido a partir de 0,2% de NaCl (m/v). Para uma mesma concentração de sal a inibição do consumo de oxigênio aumentou com o tempo de incubação das células em presença do NaCl (FIGURA 10).

### 3.4 - Efeito do NaCl nas Frações Microssomais

O efeito do NaCl nas frações microssomais de "callus" foi medido através de estimativa das áreas correspondentes às respectivas regiões dos perfis de sedimentação destas frações em gradiente de sacarose. A TABELA 4 mostra os valores destas estimativas calculadas a partir das FIGURAS 11, 12 e 13. Diante destes resultados pode-se afirmar que a adição de NaCl provocou uma diminuição conside

TABELA 3 - Efeito do NaCl no consumo de oxigênio de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitíuba.

NaCl <sup>(1)</sup> (%)	Consumo de Oxigênio					
	nmoles x min <sup>-1</sup> x 1,5 ml <sup>-1</sup>			% do Controle		
	0 <sup>(2)</sup>	24 <sup>(2)</sup>	48 <sup>(2)</sup>	0 <sup>(2)</sup>	24 <sup>(2)</sup>	48 <sup>(2)</sup>
0,0	18	18	18	100	100	100
0,2	18	16	15	100	89	83
0,4	18	14	12	100	78	67
0,8	18	11	09	100	61	50

(1) O sal foi adicionado ao meio de crescimento de células em suspensão.

(2) Tempo, em horas, decorrido entre a adição de NaCl e a determinação do consumo de oxigênio.

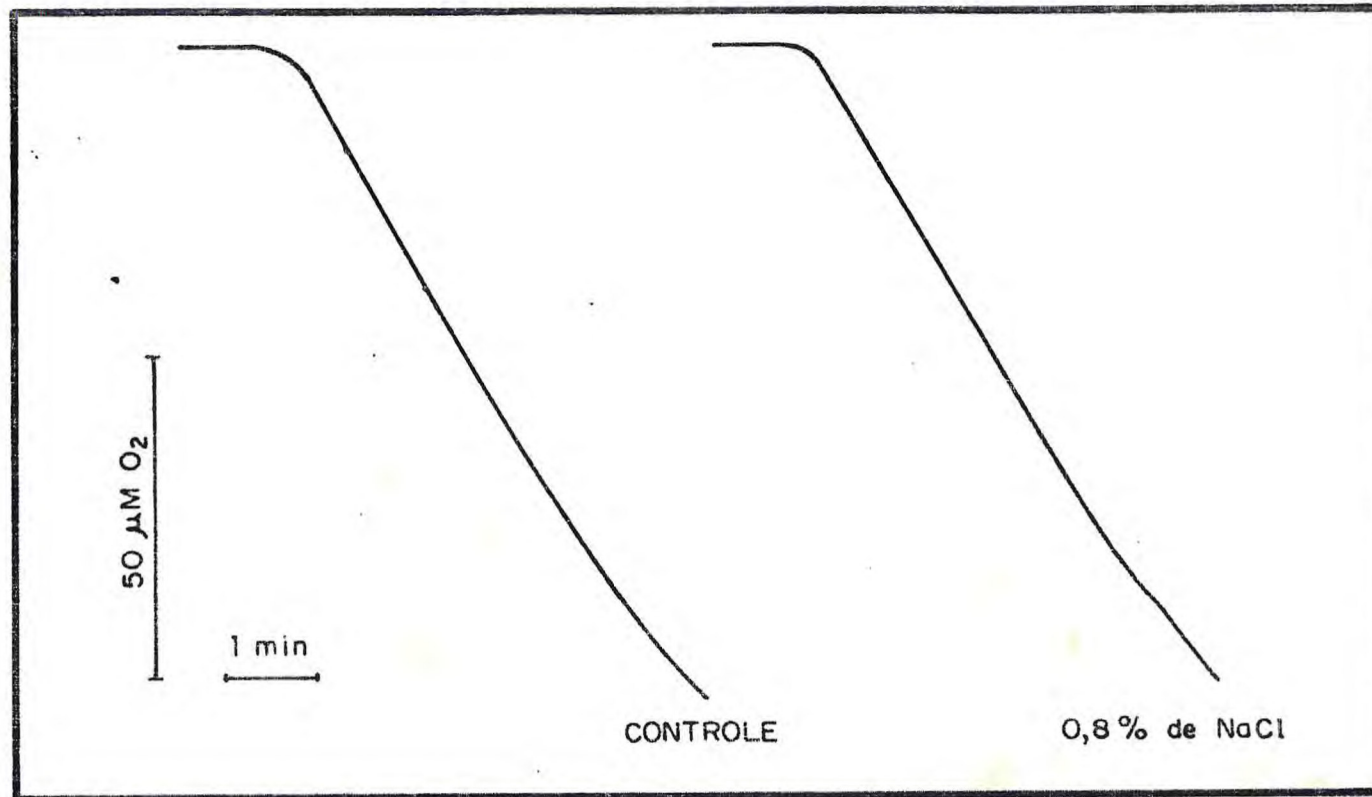


FIGURA 7 - Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. nitiúba, na ausência de NaCl (controle e na presença de 0,8% de NaCl (m/v). O NaCl foi adicionado ao meio de cultura e o consumo de  $O_2$  foi medido a seguir, na ausência de substratos exógenos. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.

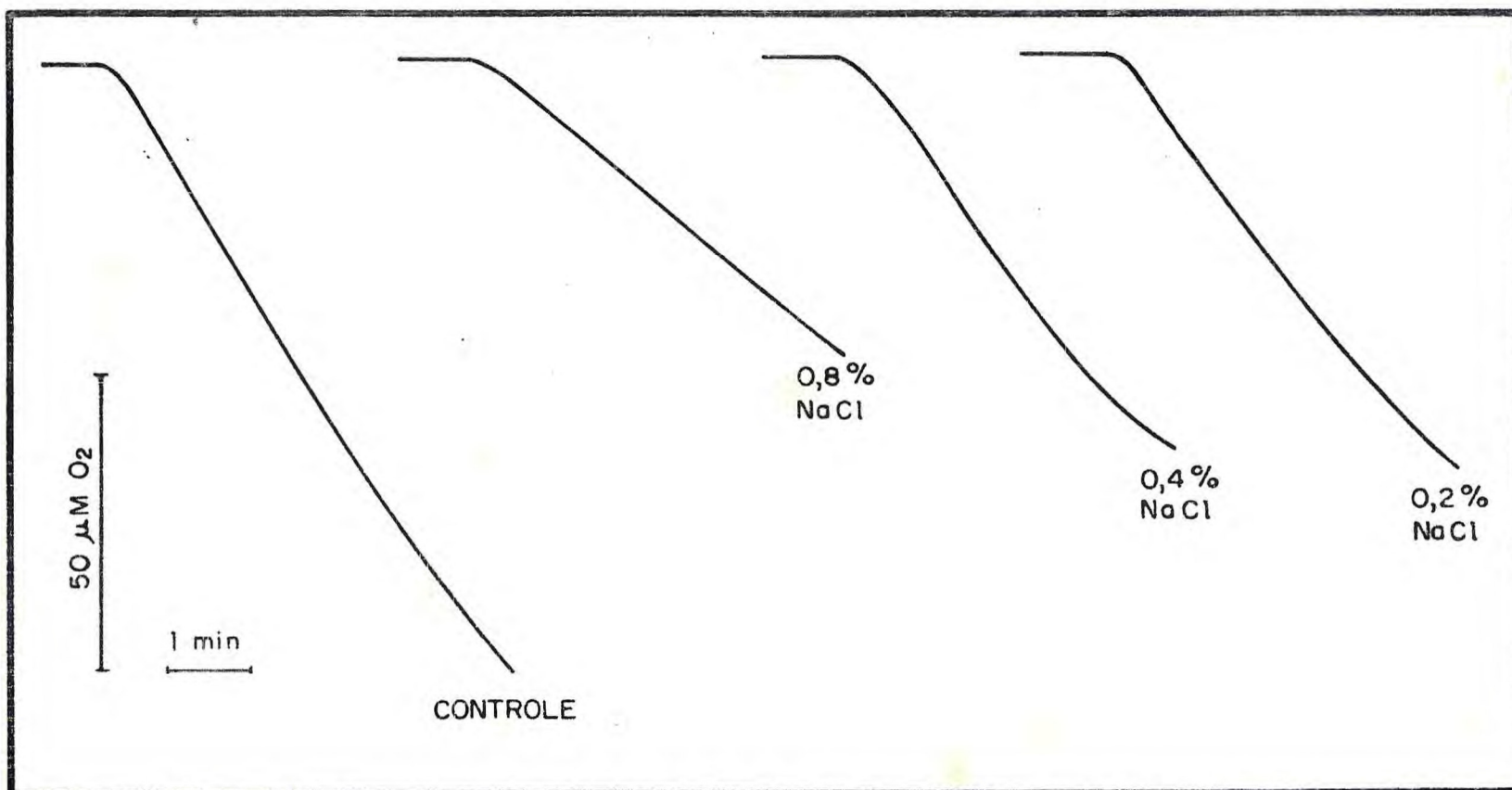


FIGURA 8 - Traçado polarográfico mostrando o consumo de oxigênio de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitiúba, na ausência de NaCl (controle) e após 24 horas da adição de NaCl ao meio de cultura. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e na legenda da FIGURA 7.

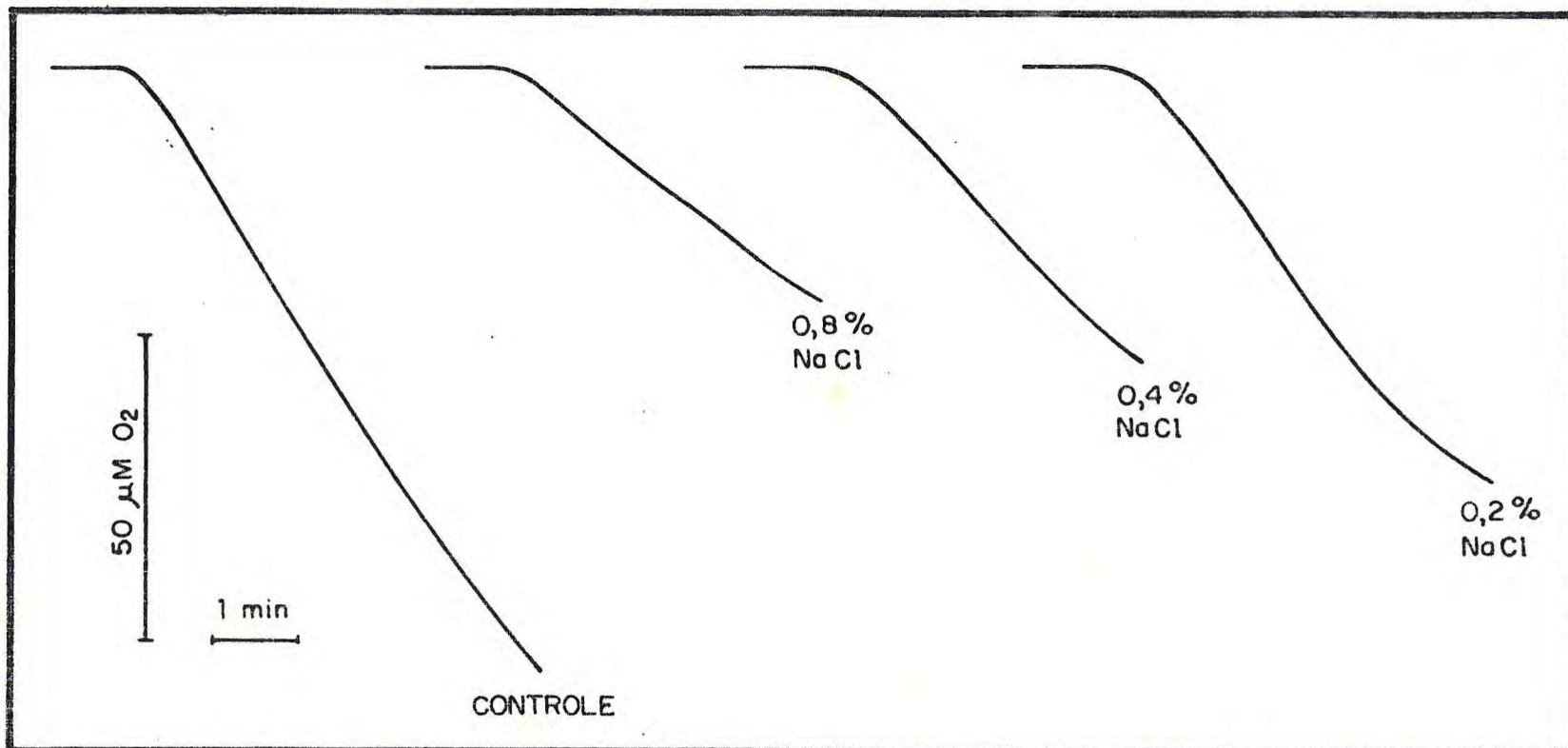


FIGURA 9 - Traçado polarográfico mostrando o consumo de oxigênio de sus<sup>u</sup> pensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp cv.pitiúba, na ausência de NaCl (controle) e após 48 horas de adição de NaCl ao meio de cultura. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e na legenda da FIGURA 7.



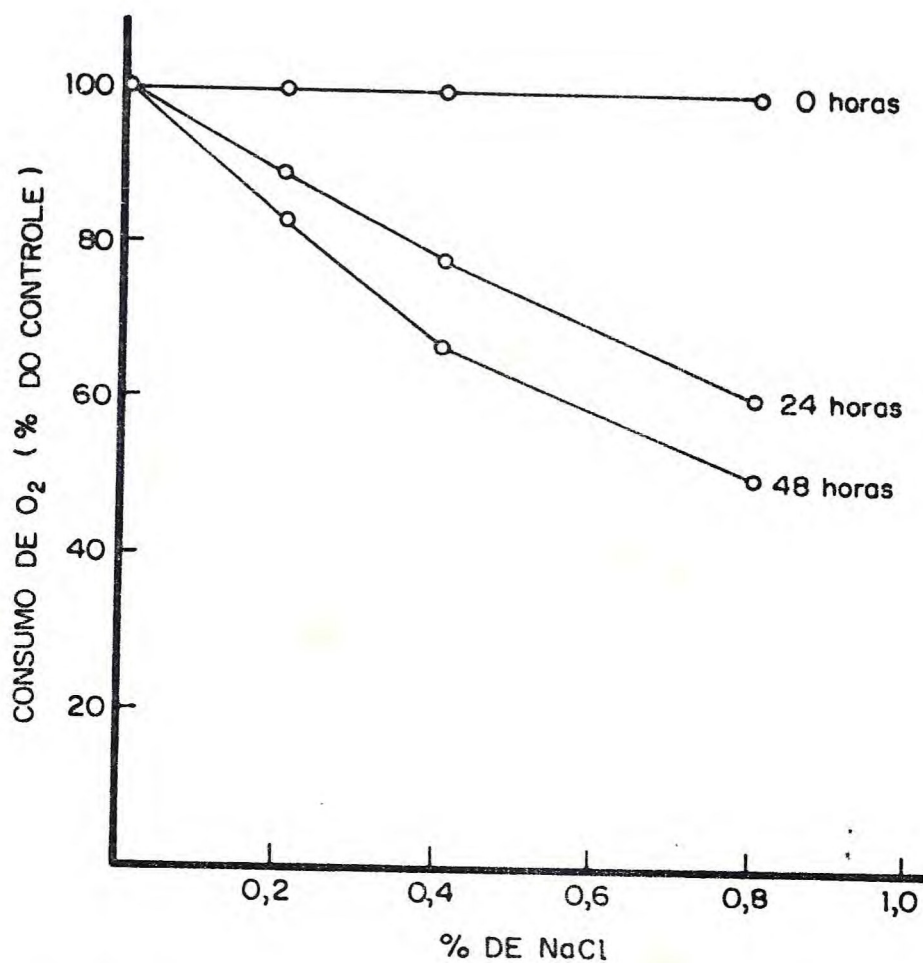


FIGURA 10 - Efeito do NaCl no consumo de oxigênio de suspensões celulares Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitiúba, após 0, 24 e 48 horas de incubação em meio de crescimento de células em suspensão. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e na legenda da FIGURA 7.

TABELA 4 - Efeito do NaCl nas frações microsossomais de "callus" de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitíuba.

Frações Microsossomais	Porcentagem do Total		
	Controle	0,4% de NaCl	0,8% de NaCl
1	1,7	1,8	2,0
2	0,3	0,8	0,8
3	1,0	1,2	1,4
4	11,4	12,6	13,3
5	6,7	9,3	10,3
6	5,0	5,8	6,9
7	4,2	4,7	5,3
8	3,8	4,2	4,6
9	4,0	4,5	5,0
10	61,8	55,1	50,3

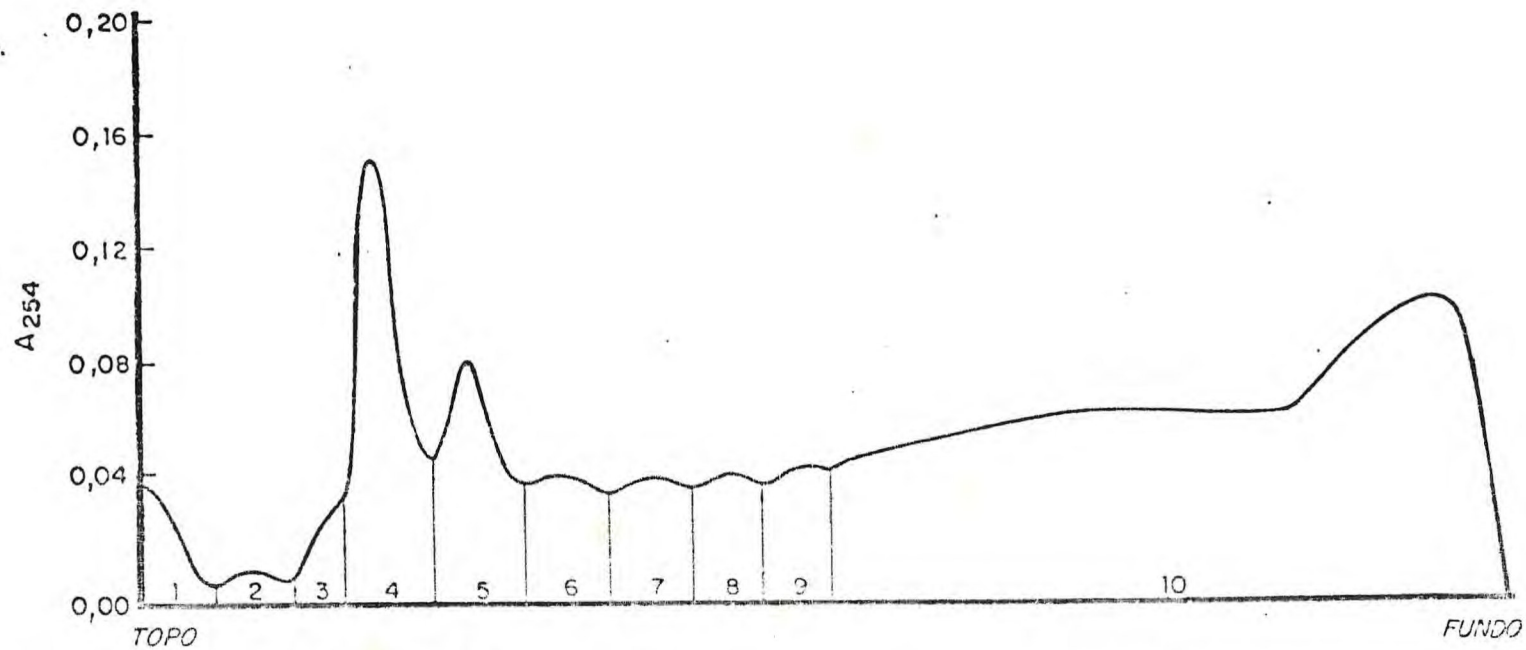


FIGURA 11 - Perfil de sedimentação da fração microssomal de "calli" de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitiúba, cultivados na ausência de NaCl. Os "calli" utilizados foram repicados em meio indutor de "callus" em explantes e o perfil de sedimentação determinado após 10 dias de incubação. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.

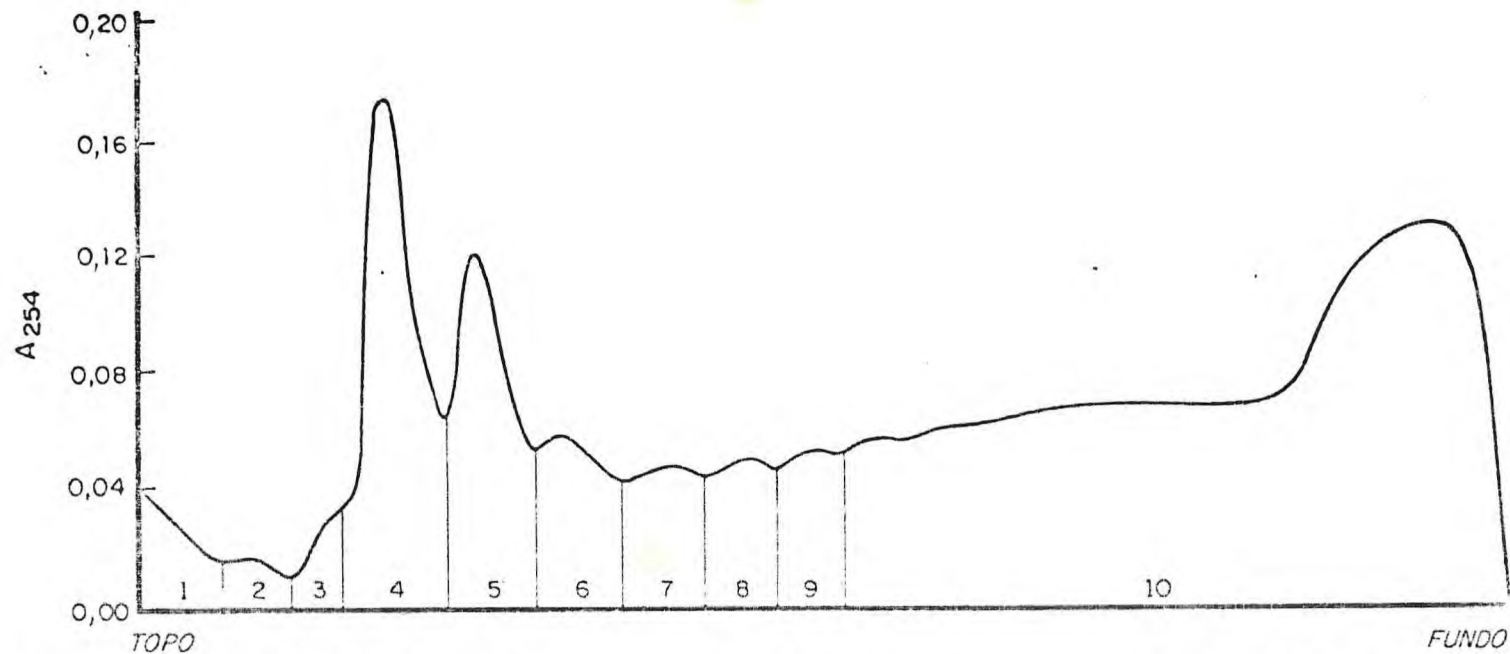


FIGURA 12 - Perfil de sedimentação da fração microsomal de "calli" de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitiúba, cultivados na presença de NaCl 0,4% (m/v). As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e na legenda da FIGURA 11.

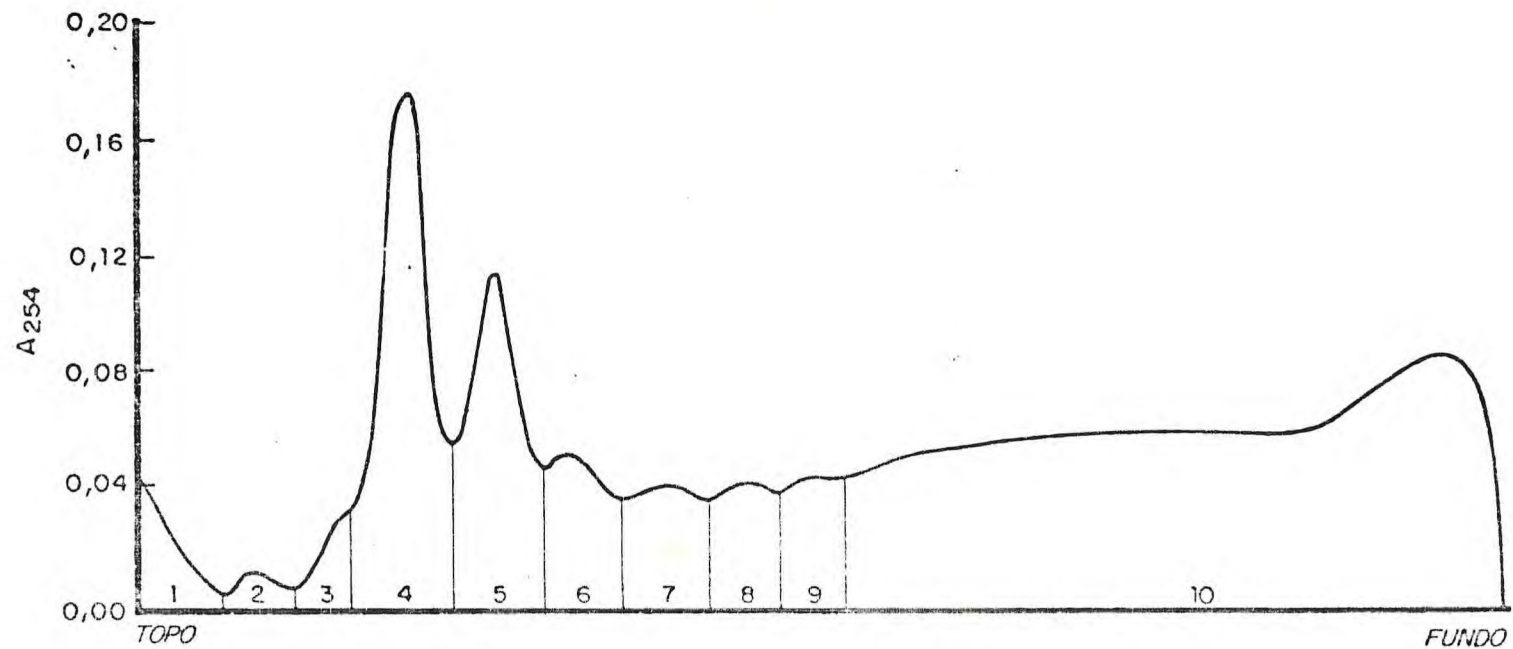


FIGURA 13 - Perfil de sedimentação da fração microsomal de "calli" de Vigna unguiculata (L.) Walp cv. pitiúba, cultivados na presença de NaCl 0,8% (m/v). As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e na legenda da FIGURA 11.

rável da região 10, diminuição esta que foi proporcional a concentração de sal. Em decorrência deste fenômeno, houve um aumento correspondentes das regiões 4, 5, 6, 7, 8 e 9. As diferenças observadas para as regiões 1, 2 e 3 foram consideradas insignificantes.

#### 4 - DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na TABELA 1 e na FIGURA 3 mostram que houve uma redução exponencial da taxa de crescimento dos "calli", induzida pelo estresse salino. Esta redução atingiu aproximadamente 79% do controle quando a concentração de sal no meio foi de 0,8% (m/v). O mecanismo de inibição do crescimento induzido pelo NaCl é ainda em nossos dias objeto de especulações. Vários estudos já foram realizados mas ainda não se chegou a um consenso sobre o mecanismo de inibição do crescimento dos "calli". Todavia, sabe-se que a salinidade do meio induz a absorção de íons, que pode propiciar uma acumulação excessiva dos mesmos e desempenhar papel relevante na inibição do referido crescimento. CHEN et al. (1980) estudando a cinética de absorção de íons durante o crescimento de "calli" de fumo encontrou alterações nos níveis de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . A análise da concentração de íons nos "calli", revelou uma elevação nos níveis de  $\text{Na}^+$  e redução nos níveis de  $\text{K}^+$ . Resultados semelhantes também foram obtidos por STROGONOV (1973). Mais recentemente, HEYSER & NABORS (1981) estudando o ajustamento osmótico de células de fumo em condições de estresse salino, observaram que as células acumulavam  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em concentrações idênticas às do meio. Diante destes fatos é provável que essas altera

ções possam desencadear distúrbios metabólicos gerais, contribuindo para explicar a redução do crescimento dos "calli".

A presença de NaCl (TABELA 2 e FIGURA 5) induziu uma redução exponencial da viabilidade celular. Esta redução da viabilidade atingiu o valor de  $1 \times 10^{-2}$  quando a concentração de NaCl era de 0,8% (m/v) enquanto o controle apresentou o valor  $1 \times 10^{-1}$ . Observou-se também que a redução da viabilidade foi acompanhada do escurecimento das colônias (FIGURA 6). Tais efeitos foram proporcionais às concentrações de sal. Como já foi discutido anteriormente, o aumento da salinidade do meio induz a absorção de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . O excesso destes íons pode determinar alterações metabólicas gerais, o que contribui para justificar a redução da viabilidade celular.

A redução progressiva do consumo de oxigênio, induzida pelo estresse salino (TABELA 3 e FIGURA 10), atingiu, após 48 horas, 50% do controle quando o nível de NaCl foi de 0,8% (m/v). Logo após a adição de NaCl ao meio de reação, o consumo do oxigênio manteve-se inalterado, independente da concentração de sal (TABELA 3, FIGURAS 7 e 10). Este fato reflete, possivelmente, uma baixa velocidade de penetração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  através das membranas. Com o aumento do tempo de incubação em presença de NaCl (24 e 48 horas) houve, provavelmente, penetração de íons, explicando assim a redução do consumo de  $\text{O}_2$  (TABELA 3, FIGURAS 8, 9 e 10). Estudos com tecidos de plantas evidenciaram que o metabolismo celular é alterado pela salinidade. Esta alteração se refle



te em modificações dos sistemas enzimáticos relacionados ou não com o metabolismo energético (WEIMBERG, 1967; FLOWERS & HANSON, 1969; PORATH & POLJAKOFF-MAYBER, 1969; FLOWERS, 1972; KALIR & POLJAKOFF-MAYBER, 1975). Já é fato conhecido que a malato desidrogenase, por exemplo, é inibida pela salinidade. Esta enzima catalisa a oxidação do malato a oxalacetato. Na ausência de oxalacetato não ocorrerá formação de citrato que é imprescindível para a sequência de reações do ciclo de Krebs. Este bloqueio do ciclo de Krebs torna impossível a metabolização de carboidratos e o fornecimento de poder redutor à cadeia de transportadores de elétrons. Outros explicam a influência da salinidade como uma ação sobre enzimas, particularmente no tocante a sua função como catalizadores do fornecimento de equivalentes de óxido-redução à cadeia respiratória mitocondrial acoplada à fosforilação oxidativa (REINALDO, 1978).

No tocante à análise do perfil ribossomal, os resultados da TABELA 4 e FIGURAS 11, 12 e 13 mostram que o estresse salino induziu a liberação de ribossomas e polissomas da região 10, provavelmente ribossomas e polissomas ligados às membranas do retículo endoplasmático. Observou-se que esta liberação foi acompanhada de um aumento correspondente das regiões 4, 5, 6, 7, 8 e 9, as quais devem representar, respectivamente, ribossomas, dímeros, trímeros, tetrameros, pentâmeros e hexâmeros livres de membranas do retículo endoplasmático. Este efeito desorganizador provavelmente está ligado à ação dos íons sobre as interações ele

trostáticas que mantêm aquelas entidades associadas (YAMAMOTO et al. 1981). Observou-se que a extensão da liberação foi proporcional às concentrações de sal. YAMAMOTO et al. (1981), também observaram "in vitro" o mesmo fenômeno, estudando a influência do NaCl sobre o sistema ribossomal de membranas tilacóides de cloroplastos. Os resultados mostraram que a salinidade foi capaz de provocar uma liberação de 41% dos ribossomas ligados às membranas, quando comparado ao controle. Acredita-se que este efeito desorganizador do sal tenha afetado qualitativa e quantitativamente os níveis de síntese de proteínas nesses locais, o que contribuiu significativamente para a redução do crescimento discutida anteriormente. Estudos de microscopia eletrônica têm sugerido que os ribossomas ligados às membranas sintetizam proteínas de exportação de importância para as funções das células, enquanto que ribossomas livres sintetizam proteínas para uso intracelular (BIRBECK & MERCER, 1961, citado por BLOBEL & POTTER, 1967). Portanto, uma deficiência na exportação dessas proteínas poderá ocasionar distúrbios metabólicos mais profundos.

Os resultados aqui obtidos, embora proporcionem uma visão relativamente ampla do problema dos efeitos da salinidade em células e tecidos vegetais não dispensam que estudos mais detalhados ainda sejam realizados.

## 5 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que:

- 1) a salinidade provocou uma redução exponencial da taxa de crescimento dos "calli", bem como escurecimento e menor friabilidade dos mesmos;
- 2) a salinidade provocou uma redução exponencial da viabilidade celular, escurecimento e diminuição das colônias formadas;
- 3) o consumo de oxigênio não foi alterado imediatamente após a adição de NaCl, mas foi reduzido com o aumento do tempo de incubação das células e o aumento da concentração do sal;
- 4) a salinidade induziu a liberação de ribossomas e polissomas das membranas do retículo endoplasmático e provocou um aumento correspondente de monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros livres.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLACK, C.A. Soil-Plant Relationships, John "Wiley & Sons, New York, U.S.A. 792p, 1968.
- BLOBEL, G. & POTTER, V.R. Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver (I). Distribution as related to total cellular RNA. J. Mol. Biol., 26: 279 - 292, 1967.
- CARLSON, P.S. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. Science., 180: 1365 - 1368, 1973.
- CHALEFF, R.S. & PARSONS, M.F. Direct selection "in vitro" for herbicide-resistant mutants of Nicotiana tabacum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75: 5104 - 5107, 1978.
- CHEN, Y., ZAHAVI, E., BARAK, P. & UMIEL, N. Effects of salinity stresses on tobacco. Z. Pflanzensphysiol., 98: 141 - 153, 1980.
- CROUGHAN, T.P., STAVEREK, S.J. & RAINS, D.W. Selection of a NaCl tolerant line cultured alfafa cells. Crop. Science., 18: 959 - 963, 1978.
- DAVIES, E., LARKINS, B.A. & KNIGHT, R.H. Polyribosomes from peas. Plant. Physiol., 50: 581 - 584, 1972.
- DIX, P.J. & STREET, H.E. Sodium chloride resistant cultured

cell lines from Nicotiana sylvestris and Capsicum annum.  
Plant Sci. Let., 55: 231 - 237, 1975.

FLOWERS, T.J. Salt tolerance in Sueda maritima (L.) Dum. The effect of sodium chloride on growth respiration and soluble enzymes in comparative study with Pisum sativum, L. J. Exp. Botany., 23: 310 - 321, 1972.

FLOWERS, T.J. & HANSON, J.B. The effect of reduced water potential on soybean mitochondria. Plant. Physiol., 44: 939 - 945, 1969.

FLOWERS, T.J., TROKE, P.F. & YEO, A.R. The mechanism of salt tolerance in Halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol., 28: 89 - 121, 1977.

GOES, E.S. O problema da salinidade e drenagem em projetos de irrigação do Nordeste e a ação de pesquisa com vistas a seu equacionamento. Em Anais da Reunião sobre Salinidade em Áreas Irrigadas. D.A.A. SUDENE. Recife, Pernambuco, Brasil, 20p, 1977.

HEYSER, J.W. & NABORS, M.W. Osmotic adjustment of cultured tobacco cells (Nicotiana tabacum var. Sansum) grown on sodium chloride. Plant Physiol., 720 - 727, 1981.

HORSCH, R.B. & JONES, G.E. A. A double filter paper technique for plating cultured plant cells In Vitro, 16: 103 - 108, 1980.

- HUBER, J., CONSTABEL, F. & GAMBORG, O.L. A cell counting procedure applied to embryogenesis in cell suspension culture of anise (Pimpinella anisum L.) Plant Sci. Let., 12: 209 - 215, 1978.
- KALIR, A & POLJAKOFF-MAYBER, A. Malic dehydrogenase from Tamarix roots. Effects of sodium chloride in vivo and in vitro. Plant. Physiol., 55: 155 - 162, 1975.
- LIVNE, A. & LEVIN, N. Tissue respiration and mitochondrial oxidative phosphorylation of NaCl-treated pea seedlings. Plant. Physiol. 42: 407 - 414, 1967.
- MARX, J.L. Plants: Can they live in salt water and like it? Science., 206: 1168 - 1169, 1972.
- MATOS BRITO, A.E.R. Estudo sobre regeneração de plantas de Vigna unguiculata (L.) Walp. a partir de suspensões celulares. Dissertação de Mestrado. UFC. Fortaleza, Ceará, Brasil. 78p, 1980.
- NABORS, M.W., DANIELS, A., NALDONY, L. & BROWN, C. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. Plants Sci. Let., 4: 155 - 159, 1975.
- NABORS, M.W., GIBBS, S. BERNSTEIN, C. & MEISS, M. NaCl-tolerant tobacco plant from cultured cells. Z. Pflanzenphysiol., 97: 13 -17, 1980.
- OSWALD, T. H., SMITH, A. E. & PHILLIPS, D. V. Callus and plantlet regeneration from cell cultures of Ladino clover and soybean. Physiol. Plant., 39: 129 - 134, 1977.

- PHILLIPS, G.C. & COLLINS, G.B. "In vitro" tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop. Science., 19: 59-64, 1979.
- PORATH, E. & POLJAKOFF-MAYBER, A. The effect of salinity on the malic dehydrogenase of pea roots. Plant Physiol., 44: 1031 - 1034, 1969.
- PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do estresse salino. Revta. Brasil. Bot., 3: 85 - 94, 1980.
- REINALDO, M.C.R. Influência da salinidade na atividade oxidativa e fosforilante de mitocôndrias de Vigna sinensis (L.) Savi cv. pitiúba. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. UFC. Fortaleza, Ceará, Brasil, 77p, 1978.
- STEWART, F.C. The control of growth in plant cells. Scientific American., (oct.): 104 - 113, 1963.
- STROGONOV, B.P. Structure and function of plant cells in saline habitats. New trends in the study of salt tolerance. Translated from Russian edition (Moscow, 1970). MERCADO A. & GOLLEK, B. Transl. Ed. Halsted, New York, and Israel Program for Scientific Translation Jerusalém, 284pp, 1973.
- WEIMBERG, R. Effect of sodium chloride on the activity of soluble malate dehydrogenase from pea seeds. J. Biol. Chem., 242: 3000 - 3006, 1967.

WILDHOLM, J. M. Cultured carrot cell mutants: 5  
methyltryptophan resistance trait carried from cell to  
plant and back. Plant. Science Letters., 3: 323 - 330,  
1974.

YAMAMOTO, T., BURKS, J., AUTZ, G. & JAGENDORF, A.T. Bound  
ribosomes of pea chloroplast thylakoid membranes :  
Location and release "in vitro" by high salt, puromycin  
and RNase. Plant Physiol., 67: 940 - 949, 1981.



7 - ANEXOS

## C4

EFEITO DA SALINIDADE SOBRE A VIABILIDADE DE SUSPENSÕES CELULARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP cv. PITIUBA

A.M. Aquino e R.J. Martins

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal, 1065, 60.000 - Fortaleza - Ceará.

Suspensões celulares obtidas pela dispersão das células de "calli" friáveis induzidas em secções cotiledonares proximais de sementes germinadas por 3 dias em "Potato Dextrose Agar", apresentando  $1,2 \times 10^6$  células/ml em meio básico:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12,5 mM,  $\text{KNO}_3$  9,9 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2,1 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,14 mM,  $\text{KCl}$  0,9 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,2 mM,  $\text{MnSO}_4$  26,0  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  25,9  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  5,2  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KI}$  4,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CoCl}_2$  0,15  $\mu\text{M}$ , glicina 26,5  $\mu\text{M}$ , mio-inositol 0,56 mM, cloridrato de piridoxina 0,50  $\mu\text{M}$ , di-cloreto de tiamona 0,30  $\mu\text{M}$ , biotina 0,80  $\mu\text{M}$ , ácido nicotínico 4,0  $\mu\text{M}$  e pantotenato de cálcio 12,6  $\mu\text{M}$  acrescido de:  $\text{FeSO}_4$  0,18 mM, EDTA 9,23 mM, 2,4-D 2,26 M, cinetina 0,46 M, vitamina E 2,12 M e sacarose 2% m/v, foram semeadas em meio básico, acrescido de:  $\text{FeSO}_4$  0,07 mM, EDTA 0,09 mM, 2,4-D 2,26 M, cinetina 0,46 M, sacarose 2% m/v, agar 1% m/v e NaCl nos seguintes níveis percentuais: 0,0%, 0,2%, 0,4% e 0,8% de acordo com a técnica de HORSCH, R.B. & JONES, G.E. (in Vitro 16: 103-108, 1980). Após 4 semanas de incubação no escuro a 28-30°C os resultados foram registrados. A viabilidade, relação entre o número médio de colônias formadas e o número médio de unidades de plaqueamento por placa (uma célula isolada ou um agregado celular capaz de dar origem a uma colônia após plaqueamento e incubação), é reduzida de modo exponencial pelos níveis de NaCl acrescidos ao meio de cultura.

Auxílio financeiro: CNPq e CAPES.

II - REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA -  
RECIFE, OUTUBRO DE 1982.

ARQ. BIOL. TECNOL. 23 (3/4) 1982.

## C5

**EFEITO DA SALINIDADE SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO DE SUSPENSÕES CELULARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP cv. FITIUBA**

A.M. Aquino &amp; R.J. Martins

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 1065, 60.000 - Fortaleza - Ceará

Suspensões celulares obtidas pela dispersão das células de "calli" friáveis induzidas em secções cotiledonares proximais de sementes germinadas por 3 dias em "Potato Dextrose Agar", apresentando  $6,8 \times 10^5$  células/ml em meio básico:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12,5 mM,  $\text{KNO}_3$  9,9 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  26,0  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  25,9  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  5,2  $\mu\text{M}$ , KI 4,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CaCl}_2$  0,15  $\mu\text{M}$ , glicina 26,5  $\mu\text{M}$ , mio-inositol 0,56 mM, cloridrato de piridoxina 0,50  $\mu\text{M}$ , di-cloreto de tiamina 0,30  $\mu\text{M}$ , biotina 0,80  $\mu\text{M}$ , ácido nicotínico 4,0  $\mu\text{M}$  e pantotenato de cálcio 12,6  $\mu\text{M}$ , acrescido de:  $\text{FeSO}_4$  0,18 mM, EDTA 0,23 mM, 2,4-D 2,26  $\mu\text{M}$ , vitamina E 2,12  $\mu\text{M}$  e sacarose 2% m/v, foram nos tempos zero acrescidas de NaCl para os seguintes níveis percentuais: 0,0%, 0,2%, 0,4% e 0,8% m/v e imediatamente em seguida tiveram suas atividades respiratórias determinadas polarograficamente em amostras de 1,5 ml num oxígrafo GILSON, modelo K-1C polarizado a 0,8 V com eletrodo de CLARK acoplado à câmara de reação. As determinações polarográficas de consumo de oxigênio foram repetidas 24 e 48 horas após a adição de NaCl às suspensões celulares, as quais foram mantidas ao longo de todo o experimento a 28-30°C sob agitação rotativa (120 r.p.m.) e iluminação contínua (3.000 lux). O consumo de oxigênio das suspensões celulares aparentemente não é alterado imediatamente após a adição de NaCl nos níveis estudados, no entretanto é reduzido progressivamente com o tempo após a adição do NaCl, e de modo proporcional aos níveis de sal acrescidos.

Auxílio financeiro: CAPES e CNPq.

II - REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA -  
RECIFE, OUTUBRO DE 1982.

ARQ. BIOL. TECNOL. 23 (3/4) 1982.