

EFEITOS DA SALINIDADE NA MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS NITROGENADAS
DO FEIJÃO DE CORDA SERIDÓ (VIGNA SINENSIS (L) SAVI) DURANTE A
GERMINAÇÃO

Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de
MESTRE EM BIOQUÍMICA

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

1 9 7 5

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

<hr/> <p>José Tarquínio Prisco Orientador da Dissertação</p>	<hr/> <p>13-06-75 Data</p>
<hr/> <p>José Xavier Filho</p>	<hr/> <p>13-06-75 • Data</p>
<hr/> <p>Iracema Lima Ainouz</p>	<hr/> <p>13-06-75 Data</p>

A minha mulher,
a meus filhos,
a meus pais e
irmãos

AGRADECIMENTOS

De modo particular desejamos agradecer ao Prof. Dr. José Tarquínio Prisco, pela sua valiosa e preciosa orientação na execução desta dissertação.

Somos gratos aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará nas pessoas do Prof. Dr. José Xavier Filho, Prof^a Iracema Lima Ainouz, Prof^a Maria da Guia Silva Lima, Prof. Petrônio Augusto Pinheiro e Prof. Dr. Renato Azevedo Moreira, pela inestimável colaboração prestada ao autor.

O autor agradece ao Prof. Roberto Cláudio Frota Bezerra, do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada pela sua relevante contribuição na parte estatística desta dissertação e ao Prof. Dr. Francisco Hélio Rôla, do Departamento de Fisiologia pela sua indispensável contribuição.

Desejamos estender os nossos agradecimentos ao Conselho Nacional de Pesquisas (C.N.Pq.) e a Organização dos Estados Americanos (O.E.A) que nos ajudaram com reagentes e equipamentos utilizados no presente trabalho.

Pela colaboração prestada, o autor agradece ao Prof. Dr. Melquíades Pinto Paiva, Diretor do Laboratório de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará e ao Sr. Carlos Alberto Pontes pela revisão desta dissertação.

Finalmente, o autor deseja agradecer, de modo todo especial, aos seus pais, irmãos, esposa e filhos que, apesar de indiretamente, prestaram relevante colaboração.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
INTRODUÇÃO	1
Necessidade de pesquisas sobre bioquímica da germinação em condições de "stress" salino	1
Salinidade e a germinação de sementes	2
Efeitos da salinidade no metabolismo	4
MATERIAL E MÉTODOS	8
Sementes e condições de germinação	8
Determinação do potencial de água da solução de cloreto de sódio que inibe 50% da germinação ..	8
Análises químicas	9
Proteína	9
Nitrogênio - amino solúvel	10
Ácidos nucleicos	10
Atividade proteolítica	11
Atividade ribonucleásica	12
RESULTADOS	15
Germinação, desenvolvimento da plântula e deter- minação do potencial de água da solução salina (ψ_{NaCl}) responsável por 50% de inibição da ger- minação	15
Proteína e nitrogênio-amino solúvel	19
Atividade proteolítica	25
Ácidos nucleicos	25
Ribonuclease	31
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	41
LITERATURA CITADA	47

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
I.	Número de sementes germinadas e comprimento das plântulas do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) após 7 dias de germinação em diversos ψ_{NaCl}	16
II.	Proteína total, proteína insolúvel, proteína solúvel e N-amino solúvel em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	20
III.	Atividade proteolítica total e específica em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	26
IV.	Ácidos nucleicos totais, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	29
V.	Atividade ribonucleásica total e específica em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C) ...	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
1. Germinação de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) após 7 dias de semeadura em diversos ψ_{NaCl}	17
2. Tamanho das plântulas do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) após 7 dias de semeadura em diversos ψ_{NaCl}	18
3. Proteína total em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	21
4. Proteína insolúvel em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	22
5. Proteína solúvel em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	23
6. Nitrogênio-amino solúvel em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	24
7. Atividade proteolítica total em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	27

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

Figura	Página
8. Atividade proteolítica específica em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	28
9. Ácidos nucleicos totais em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	30
10. Ácido desoxirribonucleico (DNA) em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	32
11. Ácido ribonucleico (RNA) em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	33
12. Variação da atividade ribonucleásica de cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) em função do pH	34
13. Variação da atividade ribonucleásica de cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) em função da temperatura e do tempo de ensaio	35
14. Variação da atividade ribonucleásica de cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) em função da concentração de substrato (RNA)	36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

Figura		Página
15.	Atividade ribonucleásica total em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)	39
16.	Atividade ribonucleásica específica em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C)...	40

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

<u>bar</u>	- unidade de potencial de água que é igual a 0,987 atm ou 10^6 dina . cm^{-2} .
<u>DNA</u>	- ácido desoxirribonucleico.
<u>NBCo</u>	- Nutritional Biochemical Corporation.
<u>Protease 3,5</u>	- enzima com atividade proteolítica máxima em pH 3,5 usando-se hemoglobina como substrato.
<u>Protease 6,0</u>	- enzima com atividade proteolítica máxima em pH 6,0 usando-se caseína como substrato.
<u>RNA</u>	- ácido ribonucleico.
<u>RNase</u>	- ribonuclease.
<u>TCA</u>	- ácido tricloroacético.
<u>ΔA_{260}</u>	- diferença em absorbância medida em 260nm.
<u>ΔA_{750}</u>	- diferença em absorbância medida em 750nm.
<u>ψ_{NaCl}</u>	- potencial de água da solução de NaCl.

RÉSUMO

O presente trabalho trata da ação do NaCl na mobilização de reservas nitrogenadas, especialmente proteínas e ácidos nucleicos, durante a germinação de sementes do feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi).

As sementes foram germinadas em soluções de várias concentrações de NaCl. Os potenciais de água (ψ_{NaCl}) variaram desde 0 bar (H_2O destilada) até -6 bar. Nestas condições, as sementes permaneceram sete dias, quando, então, foram determinadas as percentagens de germinação e os tamanhos médios das plântulas que germinaram. Foram consideradas como germinadas as sementes cujas plântulas possuíam radículas com cinco ou mais centímetros de comprimento. A partir de -2 bar, foi observado que com a diminuição do potencial de água a percentagem de germinação e o tamanho das plântulas diminuíram. Partindo-se dos dados obtidos, foi determinado o potencial de água de $-4,3 \pm 0,11$ bar como responsável pela inibição de 50% da germinação. Este valor de potencial de água foi usado para comparação das mobilizações de reservas nitrogenadas das sementes germinadas neste nível de sal com o daquelas germinadas em solução não salina (água destilada).

As proteínas cotiledonárias (total, insolúvel e solúvel) diminuíram durante o processo germinativo, sendo que, para sementes germinadas em água destilada, este decréscimo foi mais acentuado do que para as germinadas em solução salina. O nitrogênio-amino solúvel em cotilédones de sementes germinadas em solução não salina alcançou valores máximos entre o terceiro e o quinto dias de germinação, decrescendo, em seguida, até o final do experimento. Nas sementes germinadas em solução salina, os valores de N-amino solúvel foram mais altos

e o máximo ocorreu no sétimo dia de germinação. A atividade proteolítica específica em cotilédones de sementes germinadas em água destilada foi maior do que a das sementes germinadas em solução salina. Os resultados sugerem um efeito inibitório do NaCl na translocação dos produtos de hidrólise dos cotilédones para o eixo embrionário.

Nas sementes germinadas em água destilada, os ácidos nucleicos totais e o ácido ribonucleico (RNA) decresceram durante todo o experimento. Em sementes germinadas em solução salina, o RNA permaneceu mais ou menos constante após o terceiro dia de germinação, enquanto que os ácidos nucleicos totais estabilizaram a partir do quinto dia de germinação. O ácido desoxirribonucleico (DNA), no controle, permaneceu mais ou menos constante até o terceiro dia, decrescendo, a seguir, até o final do experimento. Em sementes germinadas em solução salina, o comportamento do DNA cotiledonário foi semelhante ao do tratamento controle até o quinto dia de germinação. Daí em diante, o teor de DNA permaneceu constante. A atividade ribonucleásica específica em cotilédones de sementes germinadas em água destilada foi maior do que a das sementes germinadas em solução salina. O comportamento dos ácidos nucleicos e da ribonuclease nos dois tratamentos sugere um efeito inibitório do NaCl na síntese e/ou atividade desta enzima. Finalmente, o estudo de algumas das propriedades da ribonuclease do feijão de corda seridô indicou semelhança desta enzima com as RNases de outras espécies vegetais.

INTRODUÇÃO

Necessidade de pesquisas sobre bioquímica da germinação em condições de "stress" salino.

O problema da salinidade é de grande importância econômica, principalmente se considerarmos que extensas áreas do globo são salinas e imprestáveis para a agricultura. A União Soviética possui cerca de 10% de sua área constituída de solos salinos (Kovda, 1937). Cifra mais elevada pode ser encontrada em várias partes da Ásia Central, cujo caráter salino do solo se apresenta em cerca de 89% das terras irrigáveis (Federov, 1954). Nos Estados Unidos, a salinidade e o excesso de sódio são responsáveis pela redução na produtividade em cerca de 8.250.000 acres de terras irrigadas (Black, 1968). No nordeste brasileiro, apesar da falta de dados precisos, provavelmente muitas das bacias de irrigação já se encontram em adiantado estágio de salinização.

Para remediar os problemas resultantes da salinização dos solos, segue-se um dos seguintes caminhos: 1) recuperação dos solos inutilizados ou em vias de inutilização; 2) desenvolvimento de pesquisas visando o estabelecimento de melhor manejo do solo e da água nas áreas salinizadas ou em vias de salinização; 3) desenvolvimento de pesquisas no sentido de desenvolver plantas resistentes ou tolerantes ao excesso de sais. As duas primeiras alternativas envolvem grandes investimentos e somente em determinadas circunstâncias poderão ser viáveis economicamente (Strogonov, 1964, Black, 1968), enquanto que a última poderá oferecer resultados promissores, desde que se conheça a fisiologia e bioquímica de plantas cul

tivadas em condições de "stress" salino. Sendo a germinação da semente a etapa inicial para o estabelecimento de qualquer cultura, nada mais justo do que se estudar a bioquímica deste processo em condições de "stress" salino.

Salinidade e a germinação de sementes

A influência do sal sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas tem sido objetivo de inúmeros estudos. Entretanto, seus efeitos sobre a germinação de sementes e desenvolvimento das plântulas é um tema pouco estudado e, consequentemente, pouco compreendido. A maneira como os sais manifestam sua ação deletéria sobre a germinação tem motivado muitas hipóteses. Entre elas, as mais populares são as que associam a inibição da germinação ao efeito osmótico dos sais (hipótese osmótica), ao efeito tóxico (hipótese da toxidez), e, finalmente, a hipótese dos efeitos combinados ou simplesmente hipótese dos efeitos osmótico-tóxicos.

É sabido que o excesso de sal no solo é prejudicial à germinação de sementes (Strogonov, 1964). O excesso de sal provoca um abaixamento no potencial de água do solo (Black, 1968) que irá acarretar uma diminuição na absorção de água pela semente, pois a maior ou menor absorção de água por parte desta está na dependência do gradiente de potencial de água entre o solo e a semente. Se este gradiente decresce, menos água a semente absorve (Uhvits, 1946; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1963; Prisco & O'Leary, 1970a). Tendo em vista que a germinação inicia-se com a absorção de água pela semente, é evidente que o decréscimo em absorção reduz a velocidade e a percentagem final de germinação (Prisco & O'Leary, 1970a). Lyles & Fanning (1964) conseguiram atenuar este efeito tratando as sementes com água antes das mesmas serem submetidas às condi-

ções salinas, indicando que os sais exercem sua ação inibitória através de seu efeito osmótico no processo germinativo. Todavia, nos estudos de Strogonov (1964) foram observados resultados opostos aos citados acima. Ele mostrou que sementes de algodão sendo embebidas previamente e postas para germinar em solo salino, não o faziam após um, dois, e até três meses, indicando que o efeito não poderia ser somente osmótico. Baseado em dados como estes e em outros, ele concluiu que os efeitos da salinidade na germinação são primariamente tóxicos.

Do ponto de vista metodológico, torna-se muito difícil separar os efeitos osmótico e tóxico dos sais, pois as sementes respondem a ambos simultaneamente. Apesar disto, vários estudos foram feitos com o objetivo de separar estes efeitos. Uhvits (1946) comparou os efeitos do NaCl com os do manitol (usado como agente osmótico), no intervalo de potenciais de água que variaram de -1 a -15 atmosferas, e encontrou que ambos inibiam a germinação. Entretanto, em concentrações iso-osmótica, as respostas foram diferentes, sugerindo um efeito tóxico do NaCl, que era ampliado com aumento na concentração deste sal. A mesma metodologia foi usada por Wiggans & Gardner (1959), que, estudando os efeitos de vários agentes osmóticos sobre a germinação de Raphanus sativus e sorgo, chegaram à conclusão de que o NaCl era tóxico, quando comparado com polivinil-pirrolidona, glicose, sacarose ou manitol.

Hoje em dia, acredita-se haver uma interdependência entre a concentração do sal e o tipo de efeito que predomina na germinação. Em baixas concentrações, predomina o efeito osmótico, enquanto que, em concentrações elevadas, há a predominância do efeito tóxico. Prisco & O'Leary (1970a) demonstraram que os efeitos da salinidade na germinação de sementes de Phaseolus vulgaris eram tóxico e osmótico. Eles encontraram que quando as sementes eram submetidas a potenciais de água na faixa de 0 a -8 bar, o efeito do NaCl na germinação foi

principalmente osmótico. Todavia, em baixo potencial de água (-12 bar), a inibição da germinação foi devida a efeitos osmótico e tóxico.

Efeitos da salinidade no metabolismo

Para que se possa entender como a salinidade inibe a germinação, precisamos identificar em que etapa ou etapas do metabolismo os efeitos deletérios dos sais são exercidos e como os sais afetam o metabolismo da semente germinante.

Do ponto de vista morfológico, a germinação nada mais é do que o resultado do crescimento do eixo embrionário que rompe os envoltórios da semente para originar uma nova planta. Para que isto ocorra, são necessárias várias transformações químicas, que se verificam tanto nos órgãos de reserva como no eixo embrionário. Estas transformações são de três tipos principais: mobilização (hidrólise) dos materiais de reserva da semente; transporte dos produtos de hidrólise dos órgãos de reserva (endosperma ou cotilédones) para o eixo embrionário e; síntese de novos materiais no eixo embrionário, a partir dos produtos provenientes dos órgãos de reserva (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1963).

A maioria dos compostos nitrogenados de reserva das sementes está na forma de proteína (Koller et al 1962; Altschul et al 1966), sendo que os ácidos nucleicos constituem, também, parte destas reservas nitrogenadas. Vários registros são encontrados sobre o metabolismo proteico (Marcus & Feeley, 1965; Ghetie, 1966; Beevers, 1968; Guardiola & Sutcliffe, 1971) e sobre o metabolismo dos ácidos nucleicos (Ledoux et al 1962; Kessler & Engelberg, 1962, Barker & Hollinshead, 1967) durante a germinação em condições normais ou seja, na ausência de sais. Oota et al (1953), trabalhando com Vigna sesquipedalis,

observaram que o nitrogênio proteico nos cotilédones diminuía durante a germinação e que o mesmo ocorria com o conteúdo de ácido ribonucleico (RNA). Beevers (1968) encontrou um decréscimo de nitrogênio total durante a germinação de sementes de Pisum sativum, postulando ser isto motivado pela hidrólise das proteínas, pois a atividade proteolítica aumentou com a germinação. Palmiano & Juliano (1972) observaram que o teor de proteína em sementes de arroz decresce durante a germinação, enquanto que a atividade proteolítica cresce. Comportamento semelhante foi observado para o nível de RNA e atividade de ribonucleásica, não só em arroz (Palmiano & Juliano, 1972), como também em Pisum arvense (Barker & Hollinshead, 1967). Portanto, é de esperar-se que as proteínas de reserva, sob a ação de proteases e peptidases (Beevers, 1968), liberam ácidos aminados, que são translocados para o eixo embrionário, onde irão ser utilizados na síntese de proteínas estruturais ou de enzimas. Além disto, estes ácidos aminados podem ser utilizados para síntese de novo de proteínas enzimáticas nos órgãos de reserva (Young & Varner, 1959; Young et al, 1960). Já o RNA pode ser hidrolizado a nucleotídeos que poderão ser utilizados na síntese de outros tipos de RNA, tanto nos órgãos de reserva como no eixo embrionário. Os nucleotídeos produzidos sob a ação da ribonuclease poderão também ser empregados em outras atividades metabólicas.

Quando sementes são germinadas em substratos salinos, o seu metabolismo é alterado, porém o mecanismo exato desta alteração é objetivo de controvérsia. O efeito da salinidade sobre a incorporação de ácidos aminados em proteínas da ponta da raiz de ervilha foi estudado por Kahane & Poljakoff-Mayber (1968). Eles observaram que a salinidade não somente reduziu a capacidade das raízes absorverem leucina externa, como também reduziu severamente a capacidade do tecido para incorporar ácidos aminados dentro da proteína. Prisco & O'Leary

(1970b) encontraram resultados semelhantes, estudando o efeito do NaCl e Carbowax na síntese de proteínas do eixo embrionário de sementes de Phaseolus vulgaris em germinação. Sementes embebidas em água apresentaram maior capacidade de sintetizar proteína do que as embebidas em Carbowax ou NaCl. Estes resultados mostram que a capacidade de síntese de proteínas do eixo embrionário é função de absorção de água pela semente, mas não explicam as diferenças em germinação entre NaCl e Carbowax em baixo potencial de água (-12 bar). Estas diferenças em germinação parecem estar mais relacionadas com diferenças qualitativas em proteínas solúveis do eixo embrionário (Prisco, 1971).

Vários autores estudaram os efeitos dos sais na atividade de certas enzimas (Porath & Poljakoff-Mayber, 1964 e 1968; Hason-Porath & Poljakoff-Mayber, 1969; Kahane & Poljakoff-Mayber, 1968; Weimberg, 1967 e 1970). O grupo liderado por Poljakoff-Mayber encontrou que NaCl e Na₂SO₄ diminuíram a atividade de várias enzimas da extremidade da raiz de ervilha, quando esta planta era cultivada em soluções que continham estes sais. Resultados diferentes foram encontrados por Weimberg (1970), estudando os níveis de 18 enzimas em plântulas de ervilhas crescidas em meio altamente salino. As sementes foram germinadas em soluções de NaCl, KCl, Na₂SO₄ e solução aquosa, sendo que o aumento da salinidade foi gradativo até atingir a 5 atmosferas. Embora o crescimento no meio salino tenha sido atrofiado, as atividades específicas das enzimas foram as mesmas nos tecidos de todas as plantas. O efeito de NaCl, in vitro, sobre a atividade das enzimas malato desidrogenase, aspartato desidrogenase, glicose 6-fosfato desidrogenase e isocitrato desidrogenase, foi examinado por Greenway & Osmond (1972), utilizando espécies de plantas sensíveis e tolerantes a sais. Os resultados mostraram que a intensidade de resposta varia para cada enzima. Baixas concentrações de sal via de regra estimulam a atividade, enquanto que altas concentrações

foram invariavelmente inibidoras. Segundo Kabarrov & Aziyashvili (1967), as variações no metabolismo dos ácidos nucleicos de ervilha, repolho e beterraba, cultivados em condições de "stress" salino, dependem do nível de salinidade.

Tendo em vista o que foi exposto e, considerando que no feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi) a mobilização das reservas cotiledonárias, principalmente nitrogenadas, é uma etapa fundamental na germinação desta espécie (Prisco et al, 1975), formulou-se a hipótese de que a salinidade afeta a germinação através de seus efeitos sobre a atividade das enzimas responsáveis pela mobilização das reservas da semente. Portanto, no presente trabalho, pretendemos, utilizando cotilédones de Vigna sinensis (L) Savi germinadas em condições de "stress" salino, testar a hipótese acima descrita.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes e condições de germinação

No presente estudo utilizamos sementes do feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi) provenientes da Fazenda Experimental do Vale do Curu, Pentecostes, Ceará, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

As sementes selecionadas para a germinação foram submersas durante 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio, contendo 5,2% de cloro ativo (Q-Boa, Indústrias Químicas Anhembí S/A., São Paulo, SP). Em seguida, foram lavadas em água destilada, a fim de retirar o excesso de cloro residual, e plantadas entre duas folhas de papel medindo 30cm x 30cm (papel Mata Borrão Filtro, 80g/m², Companhia Fabricadora de Papel, São Paulo, SP). As folhas de papel foram umedecidas em 30ml de água destilada ou solução salina, e, após a semeadura, foram enroladas. Os rolos, contendo cada um 10 sementes, foram colocados em "bechers" de 500ml, tendo cada um 20ml da mesma solução usada para umedecer o papel. Estes "bechers" foram então colocados dentro de cubas de vidro e estas mantidas sob luz difusa. A temperatura de germinação registrada no interior das cubas, durante o período experimental, foi de 25 ± 1°C.

Determinação do potencial de água da solução de cloreto de sódio que inibe 50% da germinação.

Sementes de feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi) foram germinadas sob as mesmas condições descritas

no item anterior, sendo que os potenciais de água (ψ) das soluções de NaCl variaram de zero (água destilada) a -6 bar. Calculou-se a quantidade de NaCl requerida para cada solução segundo Riley (1968). A avaliação dos resultados deu-se no sétimo dia após o plantio, sendo consideradas germinadas as sementes cujas plântulas possuíam radículas com, pelo menos, 5cm de comprimento (Prisco & O'Leary, 1970a). Para cada potencial de água foram usadas quatro repetições de 50 sementes.

Determinou-se o potencial de água da solução de NaCl responsável por 50% de inibição da germinação mediante o método de Karber, segundo Lellouch & Lazar (1968).

Análises químicas

As análises químicas, quando não especificadas, foram realizadas em cotilédones de sementes germinadas no potencial de água da solução de NaCl responsável pela inibição de 50% da germinação, e em cotilédones de sementes germinadas em água destilada (potencial de água igual a 0 bar). Para estas análises, foram colhidas plântulas com 0,1,3,5,7 e 9 dias de germinação, usando-se 3 repetições, sendo que cada uma foi feita em duplicata. As etapas de extração dos componentes químicos analisados, foram feitas à temperatura de aproximadamente 4°C, a não ser quando especificada a temperatura.

Proteína

Para a determinação de proteína, foram homogeneizados 10 cotilédones com tampão fosfato 0,01M, em NaCl 0,1M, pH 7,6, numa proporção de 1 : 10 (p : v). O homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos. Mediu-se o volume do so

brenadante e se determinou a concentração de proteína. Em seguida, adicionou-se ao sobrenadante igual volume de ácido tricloro acético (TCA) a 10%. Redissolveu-se o precipitado resultante em volume de NaOH 0,1N, igual ao do sobrenadante inicial. Nesta segunda fração determinou-se a concentração de proteína, que recebeu a denominação de proteína insolúvel. A proteína solúvel foi calculada por diferença. Para a determinação da concentração de proteína utilizou-se o método do Microbiureto (Goa, 1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina, 2 x cristalina (NBCo), sendo expressa em mg de proteína por cotilédone.

Nitrogênio - amino solúvel

O nitrogênio-amino solúvel foi medido na fração solúvel em TCA, de acordo com o método de Yemm & Cocking (1955). A 0,5ml da amostra adicionou-se 1,0ml do reagente da ninhidrina, sendo a mistura colocada em banho-maria (100°C) por 15 minutos. Em cada tubo foram adicionados 4,0ml de etanol a 50%, com agitação. A cor desenvolvida foi lida a 570nm, em espectrofotômetro Spekol. Calculou-se a concentração de N-amino solúvel por comparação com uma curva padrão de L-leucina (Merck) e expressa em µg de N-amino por cotilédone.

Ácidos nucleicos

A extração e a determinação de ácidos nucleicos foram feitas de acordo com Cherry (1962). Para cada determinação usaram-se dois cotilédones, que, após homogeneizados com 4,0ml de metanol a frio, foram centrifugados. O precipitado foi lavado com 3 porções de 4,0ml de metanol, repetindo-se a centrifugação em cada lavagem. O resíduo obtido tratou-se com

6,0ml de ácido perclórico a 0,2M, a frio. O precipitado obtido mediante centrifugação foi tratado com 6,0ml de álcool etílico absoluto e centrifugado. Novamente, tratou-se o precipitado com 6,0ml de uma mistura de etanol-eter (2:1), a 50°C por 30 minutos, com centrifugação posterior. O precipitado resultante foi suspenso em ácido perclórico a 50% e colocado em banho-maria a 70°C por 40 minutos. Findo este tempo, colocou-se o homogenato em repouso por uma noite, em refrigerador. Obteve-se o sobrenadante por centrifugação, sendo o precipitado desprezado. Todas as centrifugações foram realizadas a 3.000 x g por 15 minutos, sendo as operações feitas à temperatura de 4°C, exceto aquelas citadas. Numa alíquota do sobrenadante leu-se a absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 290nm, em espectrofotômetro Beckmann DU. Usando-se a fórmula de Cherry (1962), foi obtida a concentração de ácido nucleico total, expressa em µg de ácido nucleico total por cotilédone. Do mesmo sobrenadante usado para determinar a concentração de ácidos nucleicos totais retirou-se uma amostra para a determinação da concentração de ácido desoxirribonucleico (DNA). A 1,0ml do sobrenadante adicionaram-se 1,5ml de difenilamina a 1%, sendo a mistura aquecida em banho-maria (100°C) por 30 minutos. A intensidade da cor foi medida em comprimento de onda de 550nm em um espectrofotômetro Spekol e a concentração calculada mediante uma curva padrão de DNA (Calbiochemistry) e expressa em µg de DNA por cotilédone. Determinou-se o ácido ribonucleico (RNA) pela diferença entre o ácido nucleico total e o ácido desoxirribonucleico (DNA) e sua concentração expressa em µg de RNA por cotilédone.

Atividade proteolítica

Para a extração das enzimas proteolíticas, foram homogeneizados 10 cotilédones com tampão fosfato 0,01M em NaCl

0,1M, pH 7,6, numa proporção de 1:10 (p : v). Centrifugou-se o homogenato a 7.000 x g por 10 minutos, sendo o precipitado desprezado. A atividade proteolítica, medida no sobrenadante, foi determinada como a capacidade de hidrolizar caseína e hemoglobina. A reação enzimática desenvolveu-se pela adição de 0,5ml do extrato a 5,0ml de caseína (segundo Hammarsten, E. Merck AG Darmstadt) a 1% em tampão fosfato, pH 6,0 ou hemoglobina (substrato em pó OAA da Worthington Biochemical Corporation) a 1% em tampão citrato, pH 3,5. A incubação foi feita a 50°C, quando o substrato era a caseína e a 40°C quando usou-se a hemoglobina como substrato. Parou-se a reação com 1,0ml de ácido tricloro acético (TCA) a 40% (Ainouz et. al., 1972). Após 30 minutos de repouso, a mistura foi filtrada em papel filtro Whatmann 42, sendo a atividade proteolítica determinada na fração solúvel em TCA e medida pela absorbância em 750nm em espectrofotômetro Spekol, depois da reação com o reagente de Folin (Lowry et. al., 1951). O tempo zero ou branco da reação obteve-se pela adição do substrato após ter sido adicionado o TCA a 40%. Todos os valores de densidade ótica das amostras foram subtraídos dos valores dos brancos. A atividade proteolítica total foi expressa em unidade ótica por cotilédone, e a atividade específica determinada dividindo-se a atividade total por cotilédone pela concentração de proteína por cotilédone.

Atividade ribonucleásica

Considerou-se a atividade ribonucleásica como sendo a capacidade de hidrolizar ácido ribonucleico (RNA). A preparação do extrato para a atividade ribonucleásica foi semelhante àquela utilizada por Tuve & Anfinsen (1960), sendo introduzidas algumas modificações. Foram utilizados 15 cotilédones

homogeneizados com solução tampão de fosfato 0,1M, pH 5,7, numa proporção de 1,0 grama de material para 10,0ml de tampão. Centrifugou-se o homogenato a 3.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi ajustado a pH 5,1 por adição de HCl 0,5N, seguindo-se um repouso, em refrigerador, por uma noite, e posterior centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos. Todas as operações realizaram-se à temperatura de aproximadamente 4°C. Os extratos foram obtidos, a não ser quando especificado, de cotilédones provenientes de plântulas com 5 dias de germinação. Tendo em vista que o RNA inicialmente utilizado como substrato apresentava uma prova em branco bastante elevada tornou-se necessário uma purificação. Nesta purificação usou-se o método de Crestifield et al (1960), ligeiramente modificado. O RNA (NBCo) foi suspenso em água destilada e filtrado, sendo o resíduo lavado várias vezes com água destilada. Trouxe-se o filtrado com etanol a 70%, numa proporção de um volume do filtrado para dois volumes de etanol. Por centrifugação a 3.000 x g durante 15 minutos obteve-se um precipitado, o qual foi submetido a idêntico tratamento por 3 vezes consecutivas. Finalmente, dializou-se o precipitado contra água destilada por uma noite. O dializado, após liofilização, foi testado quanto a pureza e usado nos ensaios. Todas as operações realizaram-se à temperatura de aproximadamente 4°C.

Para o ensaio enzimático foram tomados 0,2ml do extrato; 1,0ml de tampão citrato 0,1M, pH 5,2; 0,7ml de RNA purificado a 0,5% e água destilada suficiente para atingir um volume final de 2,5ml. A reação se processou à temperatura de 40°C durante 20 minutos, sendo parada por adição de 0,5ml de acetado de uranila a 0,75% em HCl a 25% (Tuve & Anfinsen, 1960). Após o término da reação a mistura obtida permaneceu em repouso por 10 minutos. Do sobrenadante, obtido por centrifugação a 1.000 x g por 10 minutos, foram retirados 0,2ml e adicionados 4,8ml de água destilada, sendo a absorbância lida em 260nm

em um espectrofotômetro Beckmann DU. O branco ou tempo zero da reação obteve-se pela adição do substrato após ter sido a dicionado acetato de uranila a 0,75% em HCl a 25%. A unidade de atividade enzimática correspondeu a variação de 0,01 de densidade ótica, sendo esta atividade expressa em unidade de atividade por cotilédone.

A determinação do pH ótimo da ribonuclease efetuou-se utilizando-se tampão citrato 0,1M nos seguintes pHs 4,0; 4,6; 5,2; 5,8; 6,0 e 6,2. Foram utilizadas temperaturas de 30, 37, 40 e 50°C. Para cada uma destas temperaturas usaram-se os seguintes tempos de incubação: 10, 20, 30 e 60 minutos. Para a escolha da concentração de substrato a ser usado, fo ram feitos experimentos em que a concentração do substrato va riou conservando-se o volume de 0,2ml do extrato.

RESULTADOS

Germinação, desenvolvimento da plântula e determinação do potencial de água da solução salina (ψ_{NaCl}), responsável por 50% de inibição da germinação.

A germinação do feijão de corda seridô em vários níveis de ψ_{NaCl} (0 a -6 bar), apresentou diferentes comportamentos quanto ao tamanho das plântulas e quanto ao número de sementes germinadas (Tabela I, Figuras 1 e 2). A percentagem de germinação diminuiu gradativamente com o aumento da concentração de NaCl, sendo que o controle apresentou 100% de germinação. Ao nível de 0 e -1 bar de potencial de água não houve diferença estatística significativa ao nível de 5% quanto ao número de sementes germinadas. A partir de -2 bar o número de sementes germinadas diminuiu, diferindo estatisticamente do controle, sendo que a -6 bar as sementes não mais germinaram (Tabela I, Figura 1). O comprimento médio das plântulas diminuiu com a diminuição no ψ_{NaCl} . Apenas a -1 bar esta média foi ligeiramente superior à média do controle (zero bar). Todos os demais níveis apresentaram plântulas com comprimento médio inferior ao do controle. A -6 bar não houve desenvolvimento das plântulas, sendo o comprimento de todas elas inferior a 5cm (Tabela I, Figura 2).

O potencial de água da solução de NaCl capaz de inibir 50% da germinação, calculado estatisticamente, foi de $-4,3 \pm 0,11$ bar. Quando sementes do feijão de corda seridô foram germinadas em solução com este valor de ψ_{NaCl} , 50% não apresentaram radículas com tamanho igual ou superior a 5cm, sendo, por conseguinte, consideradas não germinadas.

TABELA I. Número de sementes germinadas e comprimento das plântulas^a do feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi) após 7 dias de germinação em diversos ψ_{NaCl} .

ψ_{NaCl} (bar)	Número de sementes germinadas	Comprimento das plântulas (cm)
0	50,0	14,5
-1	49,8	16,1
-2	45,3*	9,0
-3	45,3*	9,0
-4	34,8*	7,1
-5	13,5*	6,3
-6	0,0*	0,0

a - Não foi feita análise estatística para comprimento das plântulas

* - Estatisticamente diferente do controle ($\psi_{\text{NaCl}} = 0$ bar) ao nível de 5%.

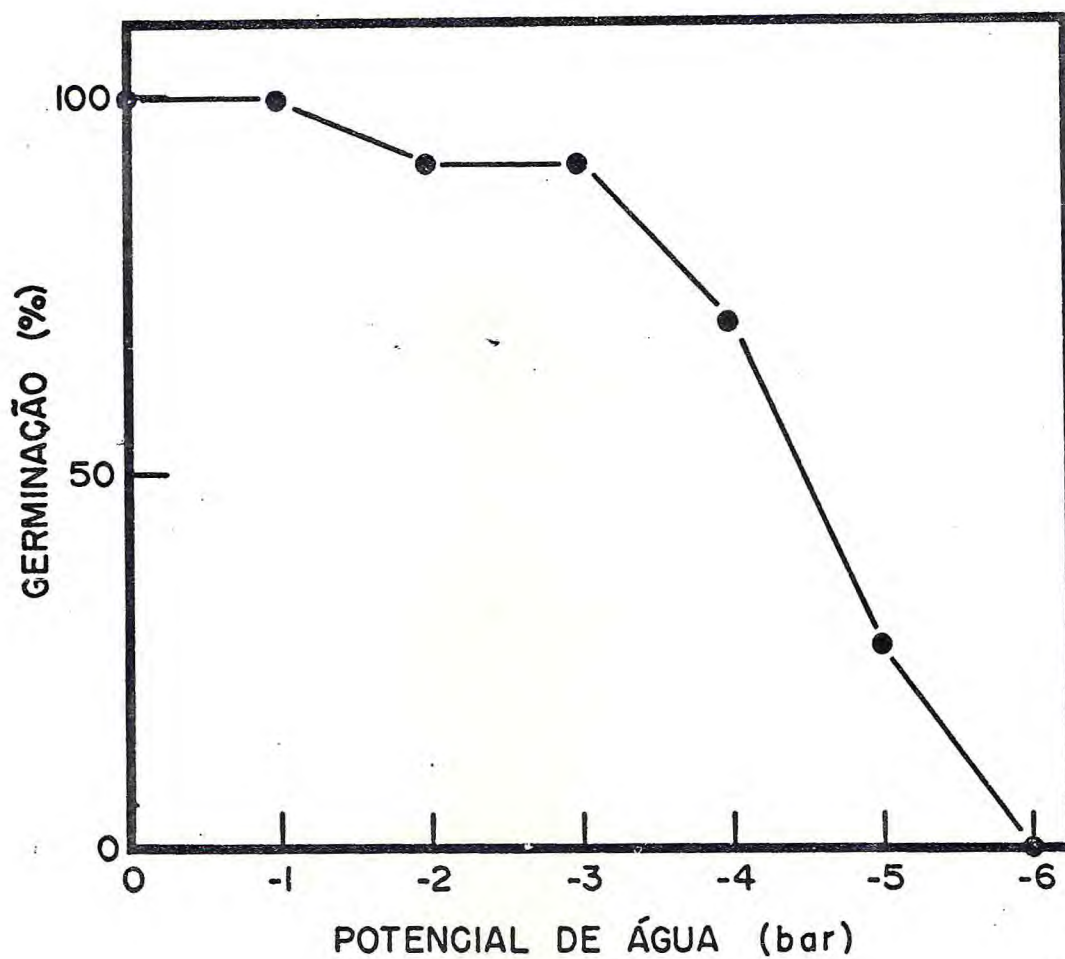


Figura 1 - Germinação de sementes do feijão de corda seridó (*Vigna sinensis* (L) Savi) após 7 dias de semeadura em diversos ψ_{NaCl} .

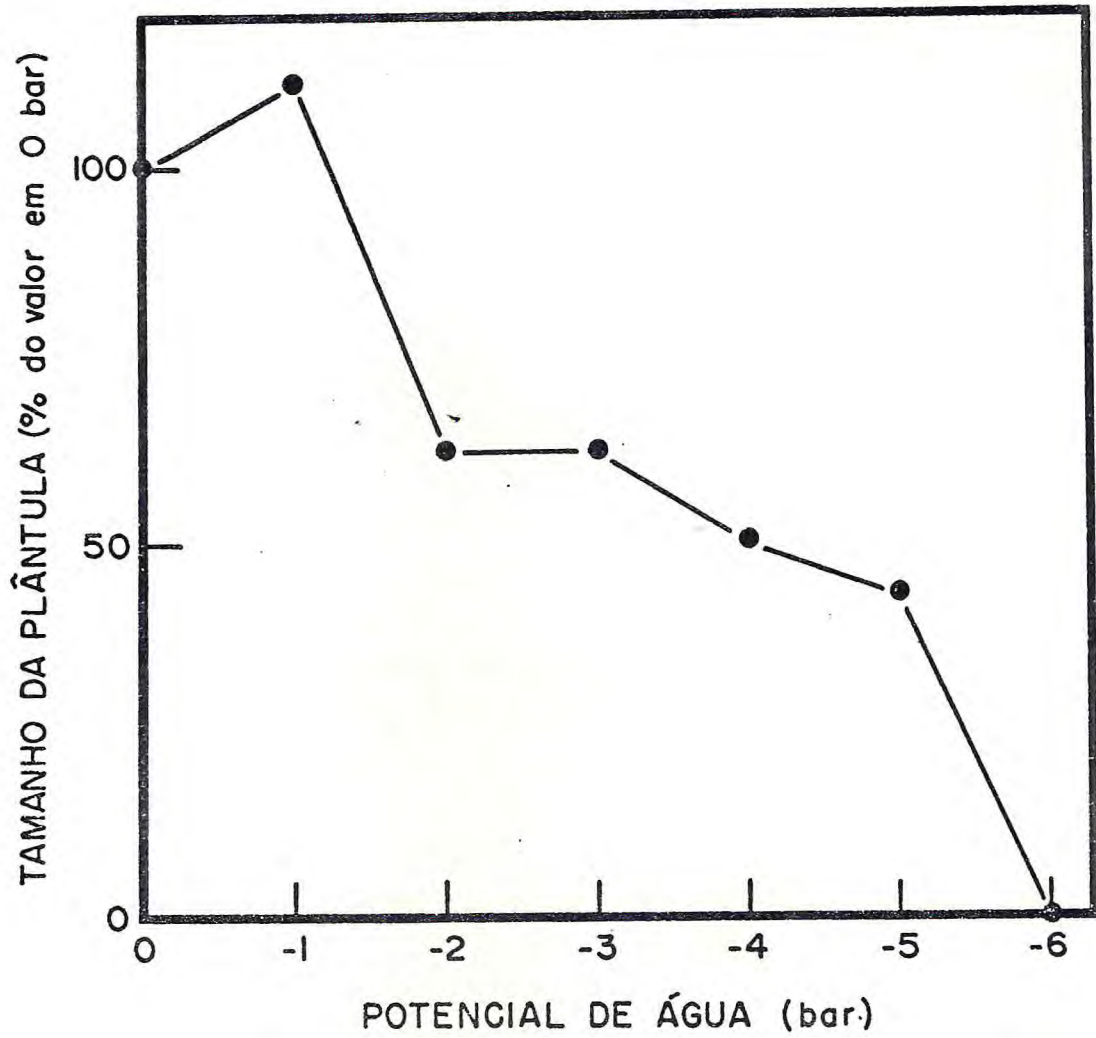


Figura 2 - Tamanho das plântulas do feijão de corda seridõ (*Vigna sinensis* (L) Savi) após 7 dias de semeadura em diversos ψ_{NaCl} .

Proteína e nitrogênio-amino solúvel

Tanto proteína total como proteína insolúvel em cotilédones de sementes germinadas em solução não salina permaneceram constantes até o primeiro dia de germinação, quando experimentaram um decréscimo gradativo até o último dia do período estudado (Tabela II, Figura 3 e 4). A concentração de proteína solúvel neste tratamento foi inferior à concentração de proteína insolúvel até o quinto dia de germinação, e de crescer, progressivamente, ao longo do processo germinativo, de um modo menos acentuado do que as concentrações de proteína total e proteína insolúvel (Tabela II, Figura 5). Para cotilédones de sementes germinadas em solução salina, a concentração de proteína total permaneceu mais ou menos constante até o terceiro dia de germinação, quando começou a decrescer, para atingir, no final do experimento, um valor que corresponde a 64,1% do valor inicial (Tabela II, Figura 3). A fração insolúvel permaneceu mais ou menos constante até o quinto dia, quando então começou a decrescer até atingir, no nono dia, 74,4% do valor inicial (Tabela II, Figura 4). A fração solúvel apresentou valores inferiores àqueles apresentados pela fração insolúvel, decrescendo, progressivamente, ao longo da germinação, até atingir, no final do experimento, um valor que corresponde a 52,5% do valor inicial (Tabela II, Figura 5). O nitrogênio-amino solúvel (Tabela II, Figura 6) em cotilédones de sementes germinadas em solução não salina alcançou valores máximos entre o terceiro e o quinto dias de germinação, decrescendo, em seguida, até o final do experimento. Em semente germinada em solução salina, o nitrogênio-amino solúvel cresceu uniformemente até o sétimo dia, quando então apresentou uma tendência decrescente. Os valores de proteína total, proteína insolúvel, proteína solúvel e nitrogênio-amino solúvel foram iguais ou mais elevados, nos cotilédones de sementes germinadas em solução salina do que nos das germinadas em solução não salina.

TABELA II. Proteína total, proteína insolúvel, proteína solúvel e N-amino solúvel em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C). O potencial de água da solução salina (ψ_{NaCl}) foi de -4,3 bar e o da não salina foi de 0 bar.

Dias de germina ção	Proteína total (mg/cot)		Proteína insolúvel (mg/cot)		Proteína solúvel (mg/cot)		N-amino solúvel (μ g/cot)	
	C	S	C	S	C	S	C	S
	0	25,1	25,1	13,3	13,3	11,8	11,8	295
1	24,6	25,0	13,6	14,0	11,0	11,0	560	601
3	20,7	24,5	12,3	14,2	8,4	10,3	1051	1395
5	17,6	22,5	9,6	13,6	8,0	8,9	1053	1469
7	11,0	20,7	4,4	12,5	6,6	8,2	504	1546
9	4,3	16,1	0,8	9,9	3,5	6,2	150	1197

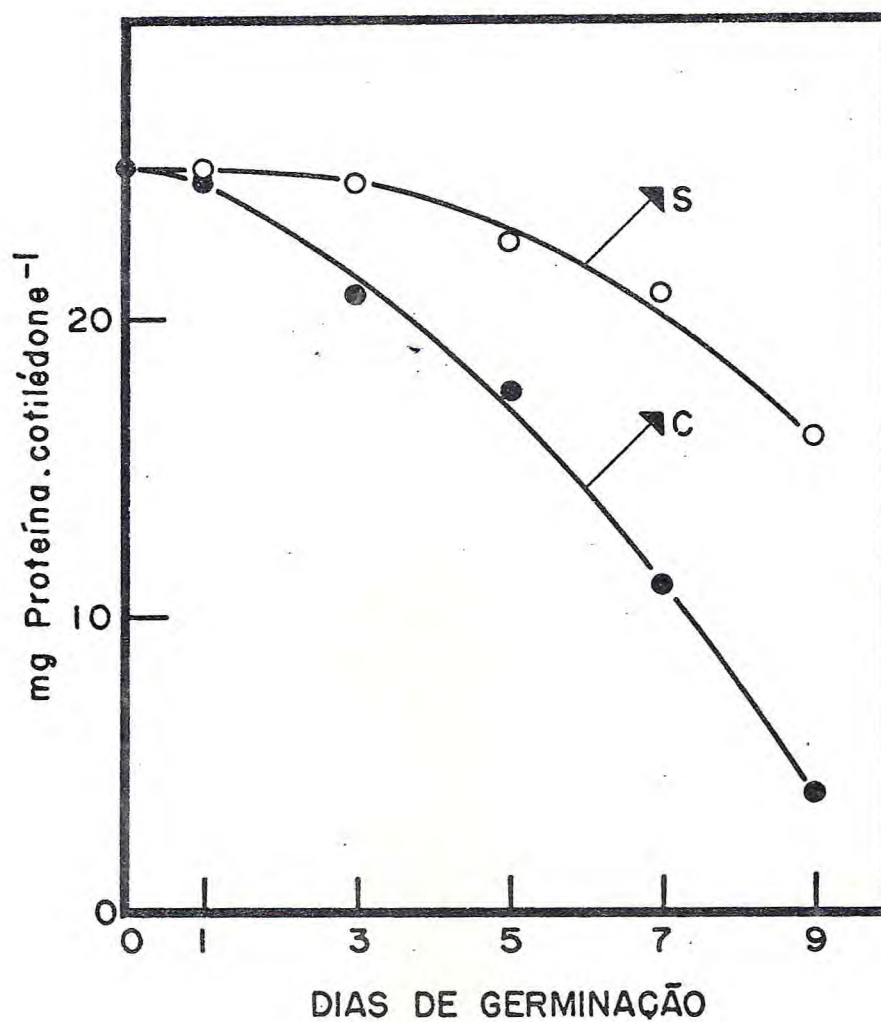


Figura 3 - Proteína total em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

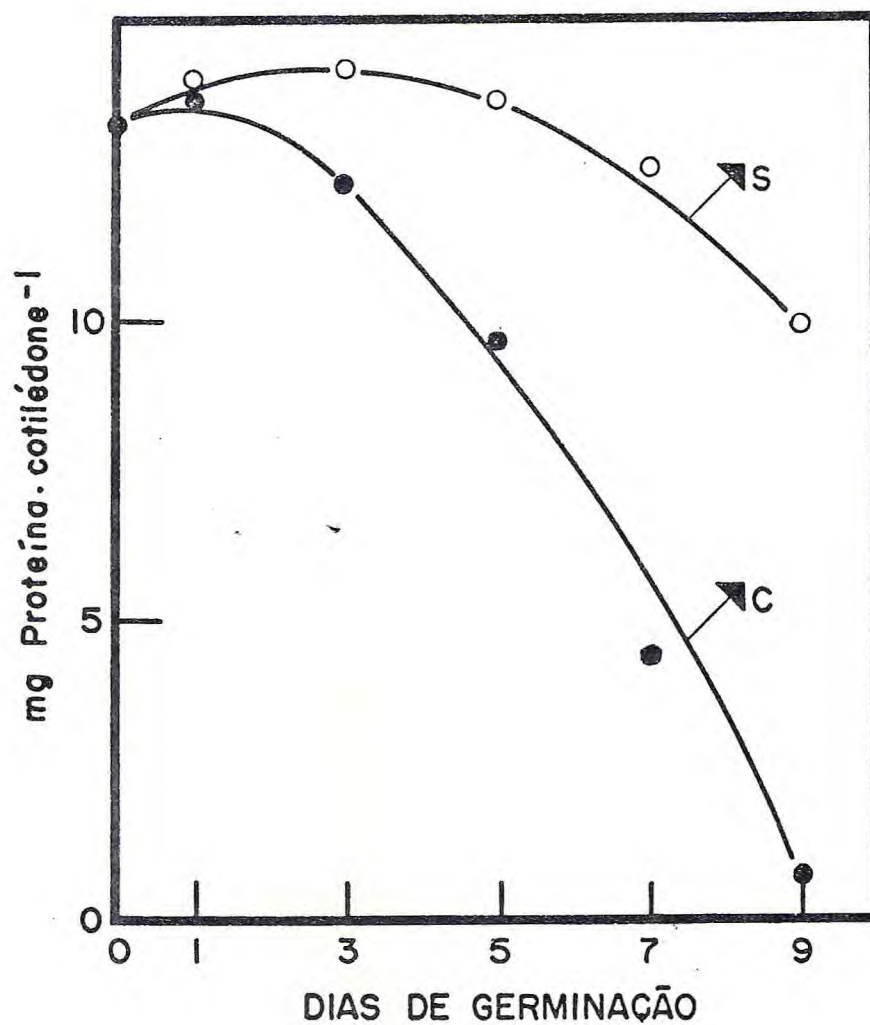


Figura 4 - Proteína insolúvel em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

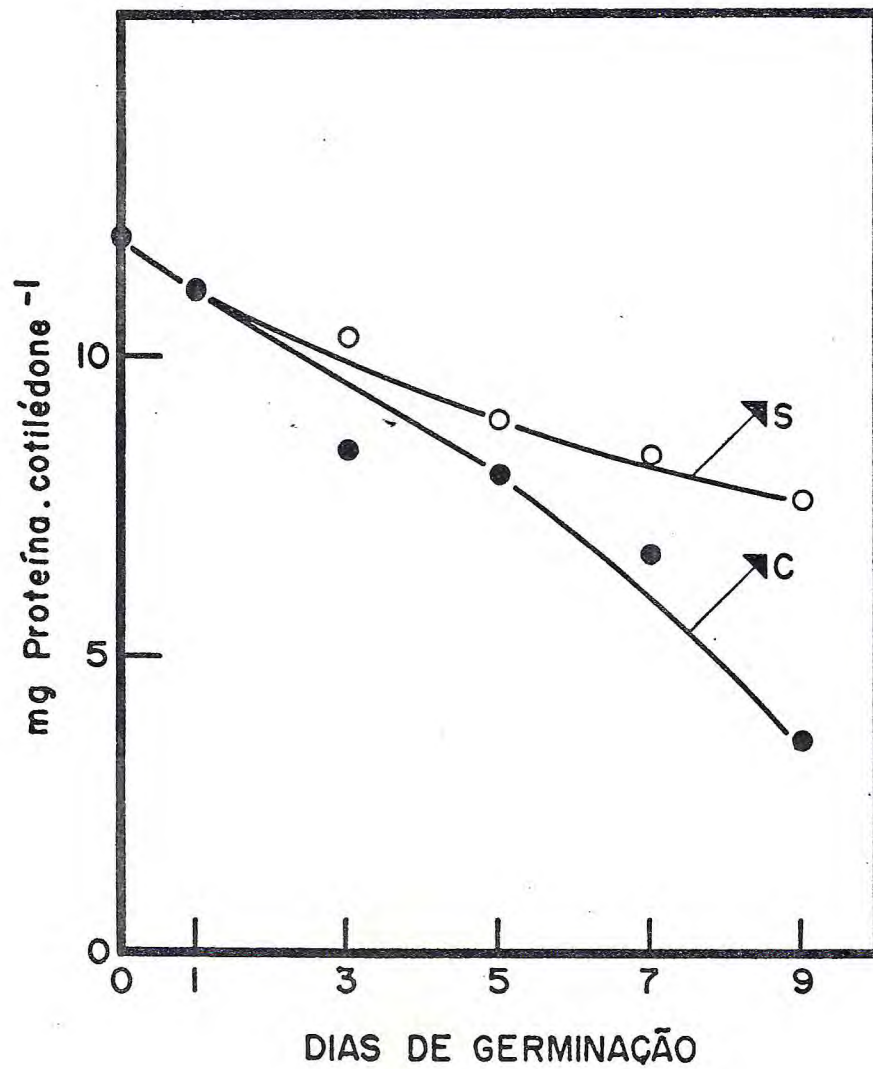


Figura 5 - Proteína solúvel em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

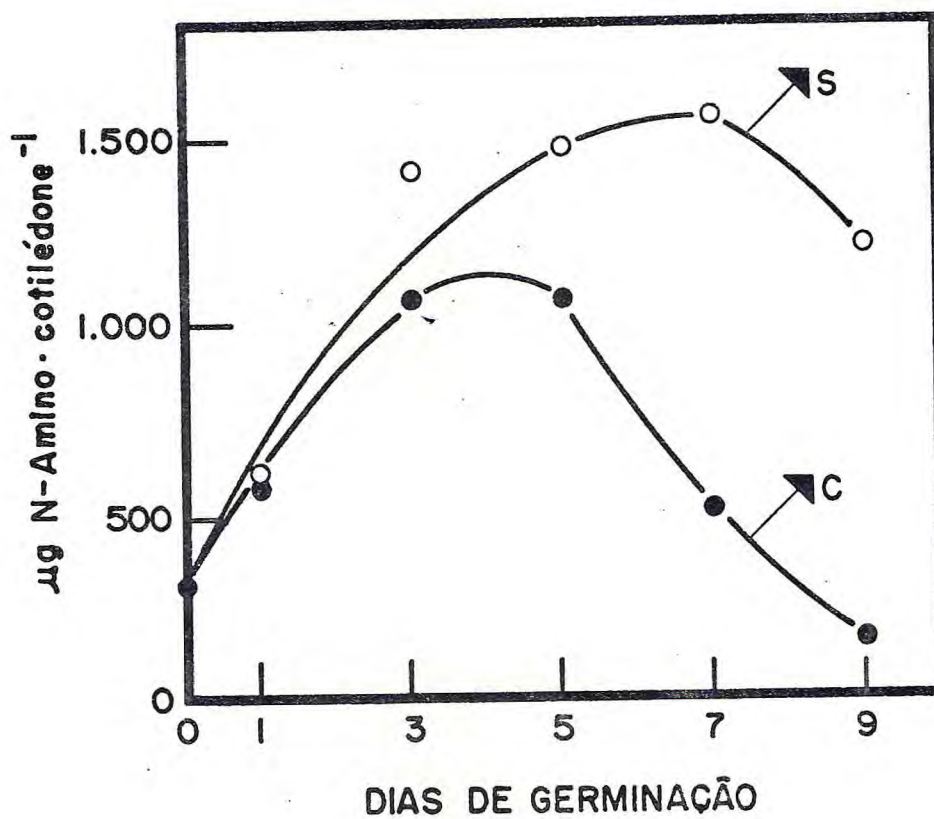


Figura 6 - Nitrogênio-amino solúvel em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica total nos cotilédones de sementes germinadas em solução não salina (Tabela III, Figura 7), tanto em pH 3,5 (hemoglobina) como em pH 6,0 (caseína), aumentou nos cinco primeiros dias de germinação, apresentando uma atividade máxima no quinto dia e decrescendo, a seguir, até o final do experimento. No nono dia de germinação (final do experimento), a atividade proteolítica em pH 6,0 foi ligeiramente superior àquela apresentada por cotilédones de sementes secas (dia zero de germinação), enquanto que, em pH 3,5, essa atividade foi 65,7% da encontrada no dia zero. Para sementes germinadas em solução salina, a atividade proteolítica em pH 6,0 aumentou continuamente até o sétimo dia de germinação, tornando-se constante daí em diante. Em pH 3,5 esta atividade cresceu até o quinto dia, permanecendo constante nos demais dias de germinação. Os valores de atividade específica (Tabela III, Figura 8), em ambos os tratamentos e pHs, apresentaram-se crescentes ao longo da germinação, sendo que no grupo controle esses valores foram bem mais elevados do que no grupo de sementes germinadas em solução salina.

Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos, em geral, têm comportamentos diferentes de acordo com o tratamento usado na germinação das sementes. Os ácidos nucleicos totais, em cotilédones do feijão de corda seridô, decresceram contínua e acentuadamente até o final do experimento, nas sementes germinadas em solução não salina. Para as sementes germinadas em solução salina, os ácidos nucleicos totais decresceram até o 5º dia de germinação, quando então permaneceram constante até o último dia (Tabela IV, Figura 9). O ácido desoxirribonucleico (DNA) dos co-

TABELA III. Atividade proteolítica total e específica em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C). O potencial de água da solução salina (ψ_{NaCl}) foi de -4,3 bar e o da não salina foi de 0 bar. Na protease 6,0 usou-se caseína como substrato e o pH durante o ensaio foi de 6,0, enquanto que para a protease 3,5 usou-se hemoglobina como substrato e o pH durante o ensaio foi de 3,5.

Dias de germi- nação	P r o t e a s e 6,0				P r o t e a s e 3,5			
	Atividade total ($\Delta A_{750} \cdot \text{cot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)		Atividade específica ($\Delta A_{750} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)		Atividade total ($\Delta A_{750} \cdot \text{cot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)		Atividade específica ($\Delta A_{750} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	
	C	S	C	S	C	S	C	S
0	1,15	1,15	0,046	0,046	1,40	1,40	0,056	0,056
1	2,00	1,70	0,081	0,068	2,00	2,00	0,081	0,080
3	2,30	2,10	0,111	0,086	2,13	2,00	0,103	0,082
5	2,63	2,13	0,149	0,095	2,50	2,50	0,142	0,111
7	2,48	2,64	0,225	0,126	2,23	2,48	0,202	0,120
9	1,27	2,57	0,295	0,160	0,92	2,41	0,214	0,150

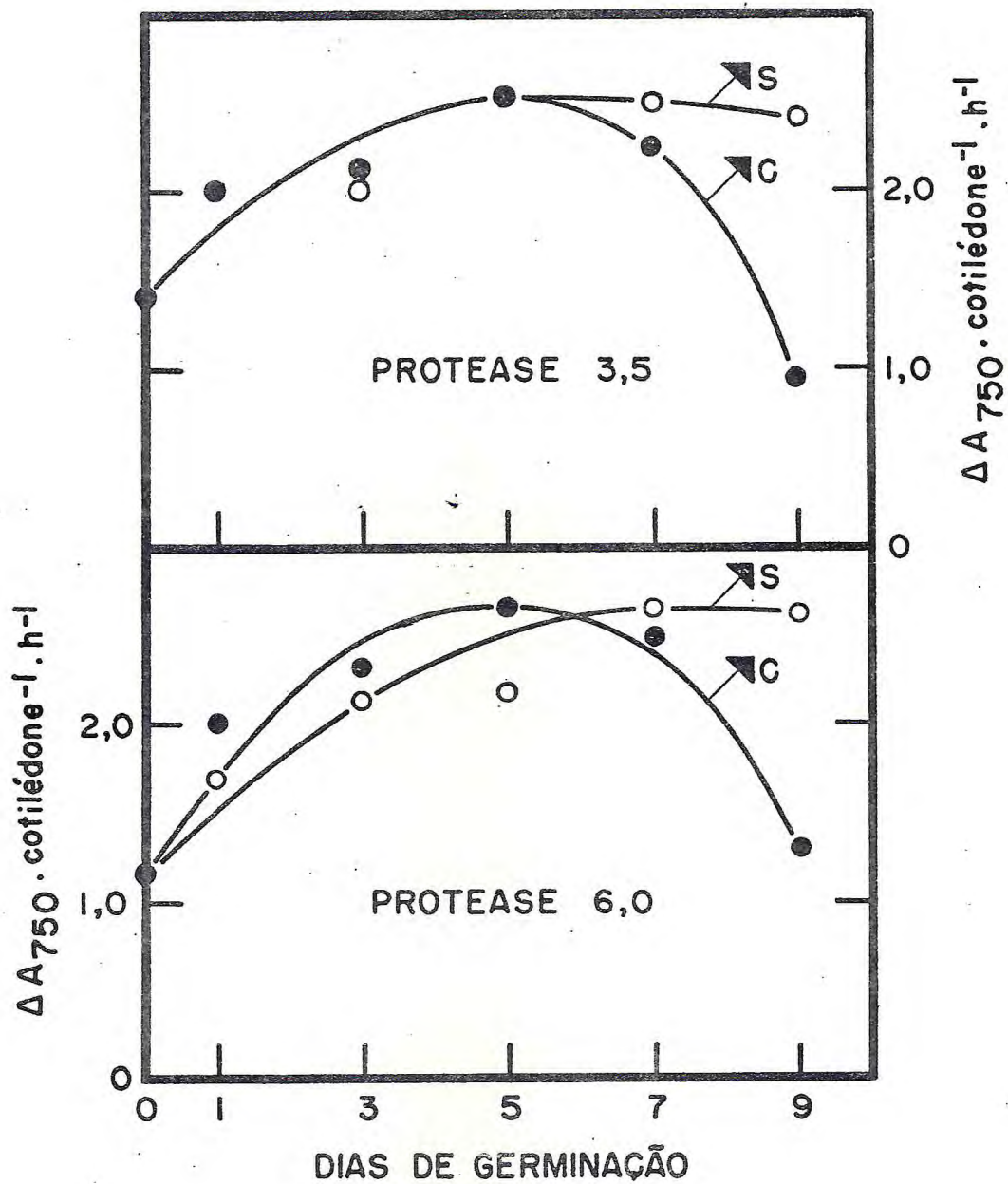


Figura 7 - Atividade proteolítica total em cotilédones de sementes do feijão de corda seridó (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

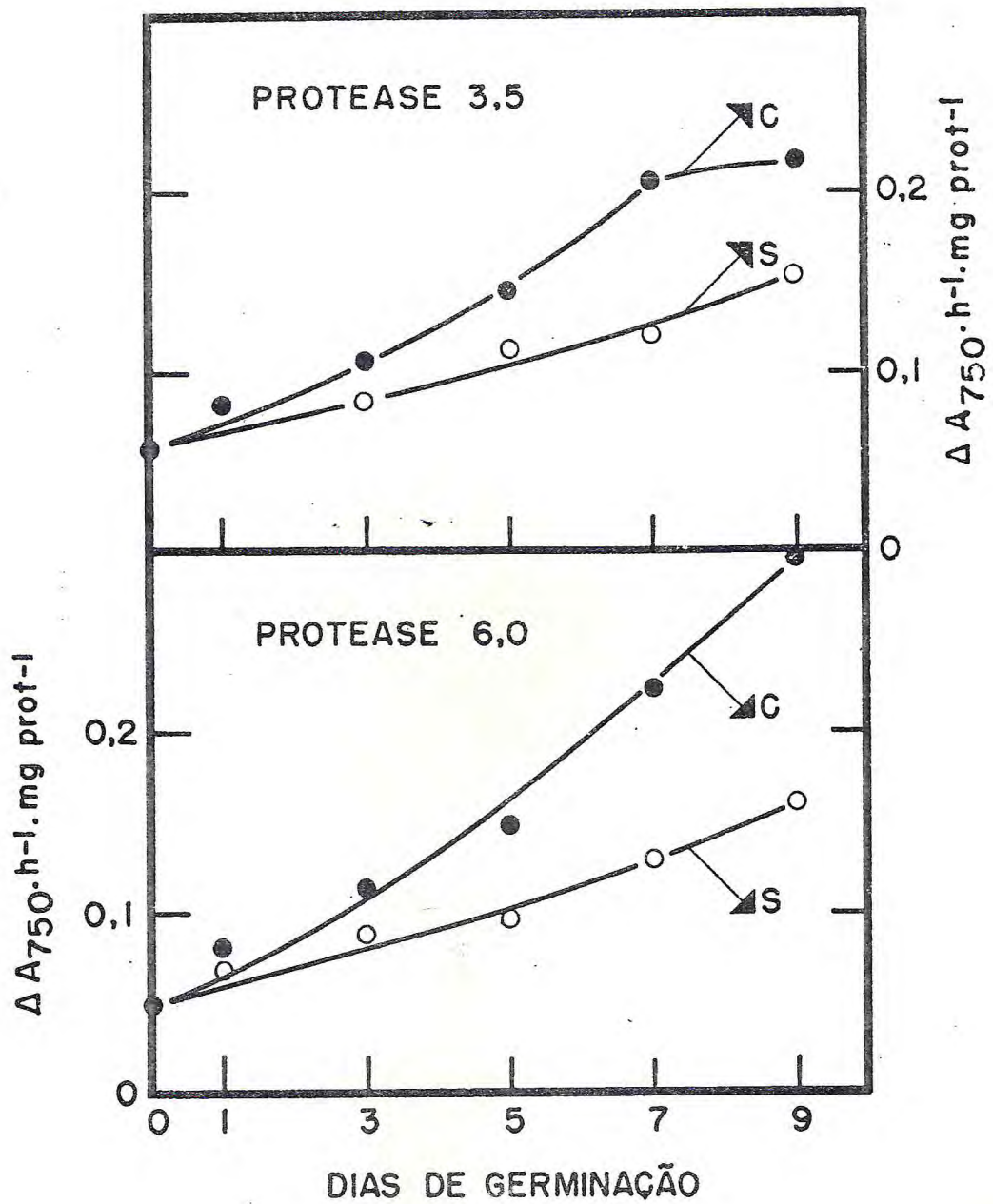


Figura 8 - Atividade proteolítica específica em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

TABELA IV. Ácidos nucleicos totais, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) em cotilédones de sementes do feijão de corda seridó (Vigna sinensis (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C). O potencial de água da solução salina (ψ_{NaCl}) foi de -4,3 bar e o da não salina foi de 0 bar.

Dias de germinação	Ácidos nucleicos totais (µg/cot)		DNA (µg/cot)		RNA (µg/cot)	
	C	S	C	S	C	S
0	446,6	446,6	137,2	137,2	309,4	309,4
1	406,9	404,5	139,8	131,8	267,1	272,7
3	330,6	319,1	131,7	126,3	198,9	192,8
5	259,9	259,9	68,0	82,1	191,9	177,8
7	188,9	244,9	54,7	71,8	134,2	173,1
9	79,1	232,4	37,0	79,2	42,1	153,2

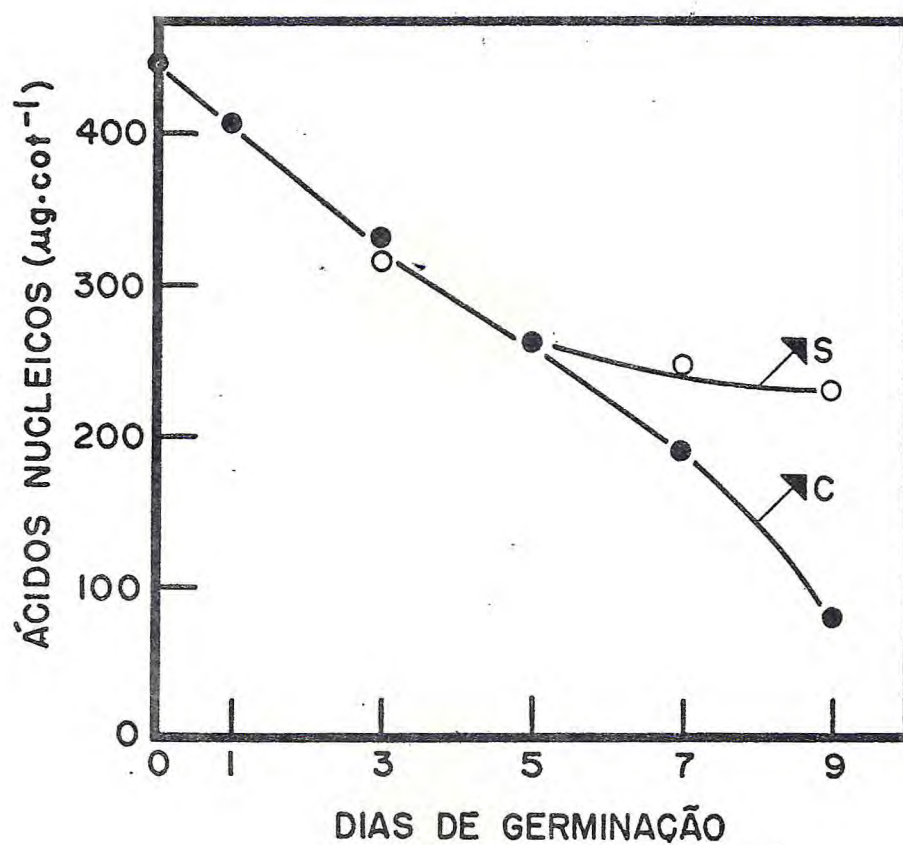


Figura 9 - Ácidos nucleicos totais em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

tilédones do grupo controle, apresentou-se mais ou menos constante nos três primeiros dias de germinação, decrescendo, acentuadamente, entre o terceiro e quinto dias, e continuando a decrescer, com menos intensidade, nos demais dias do período experimental (Tabela IV, Figura 10). Em cotilédones oriundos de sementes germinadas em solução salina, o DNA (Tabela IV, Figura 10) também mostrou-se mais ou menos constante nos três primeiros dias de germinação, apresentando uma queda entre o terceiro e o quinto dias, e permanecendo constante nos demais dias. O ácido ribonucleico (RNA) de cotilédones oriundos de sementes germinadas em solução não salina (Tabela IV, Figura 11), decresceu durante todo o período de germinação, enquanto que, para sementes germinadas em solução salina (Tabela IV, Figura 11), este decréscimo ocorreu até o terceiro dia, quando, então, o nível de RNA permaneceu mais ou menos constante até o final do experimento.

Ribonuclease

Para a determinação das condições ótimas de ensaio da ribonuclease, foram testados vários pHs, tempos e temperaturas de reação, bem como determinada a relação enzima-substrato. Todos esses parâmetros foram testados em extratos de cotilédones de sementes com 5 dias de germinação. A atividade ribonucleásica total alcançou um máximo em pH 5,2, indicando ser este o pH ótimo para a aludida reação enzimática (Figura 12). A atividade desta enzima apresentou-se crescente com o aumento do tempo e da temperatura usados na incubação (Figura 13). Na temperatura de 40°C e no tempo de vinte minutos, esta atividade apresentou uma maior linearidade com tendência a uma reta, razão pela qual foram escolhidos para os ensaios enzimáticos. A fim de que a reação enzimática se desenvolvesse na presença de excesso de substrato, foi determinada a rela-

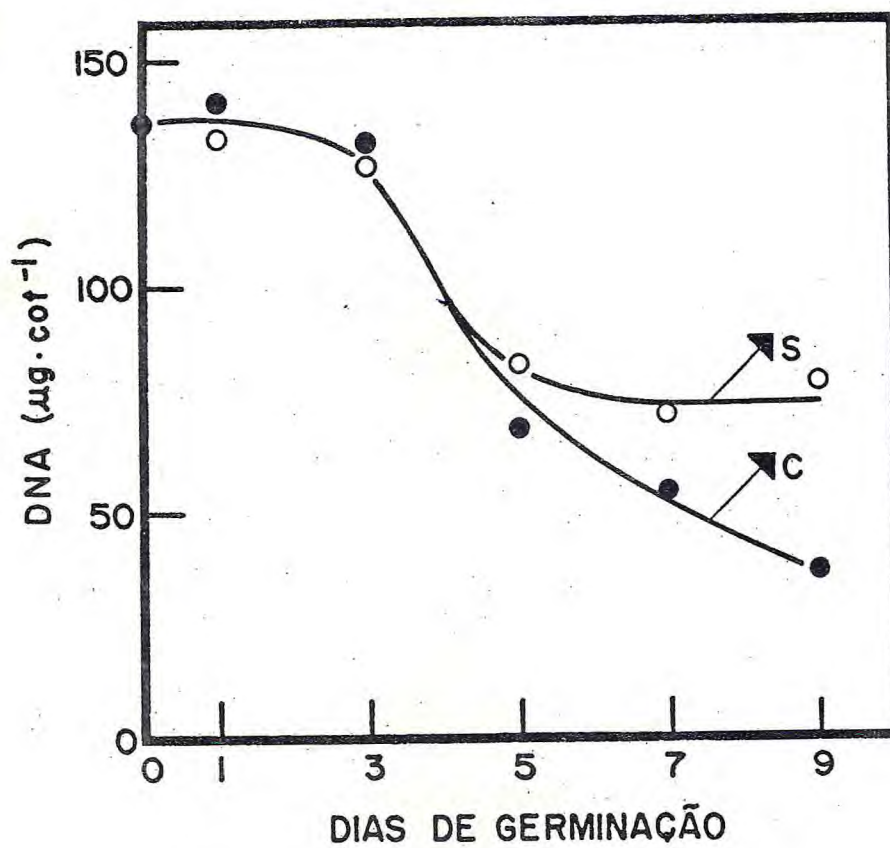


Figura 10 - Ácido desoxirribonucleico (DNA) em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

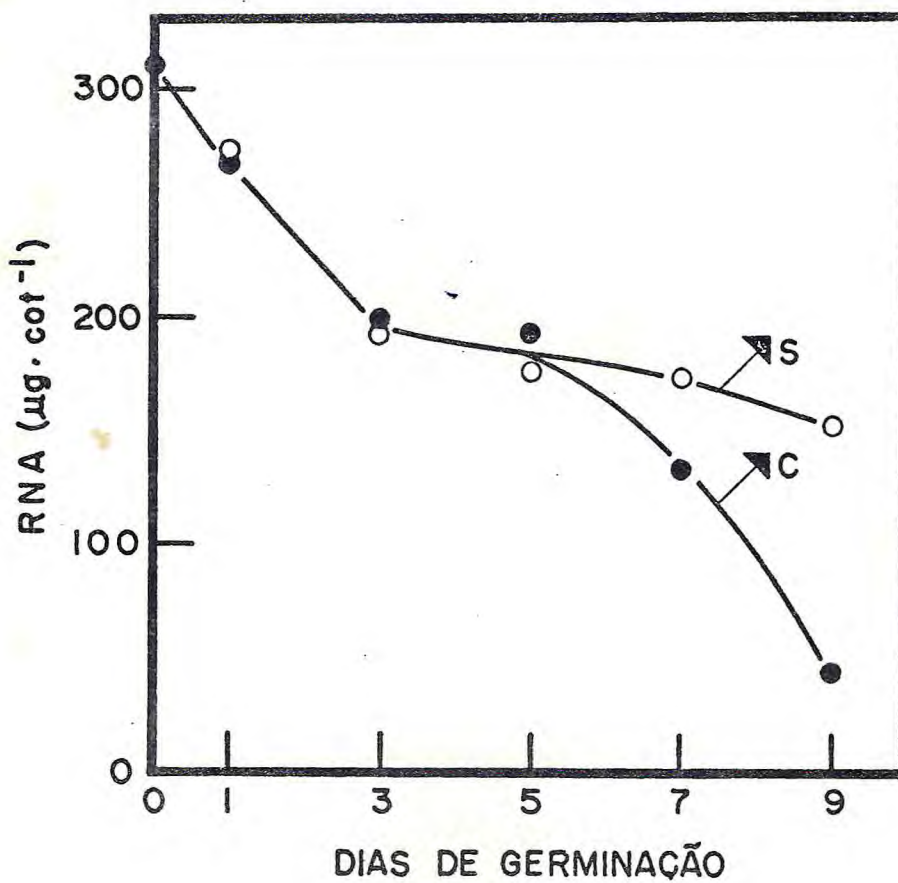


Figura 11 - Ácido ribonucleico (RNA) em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

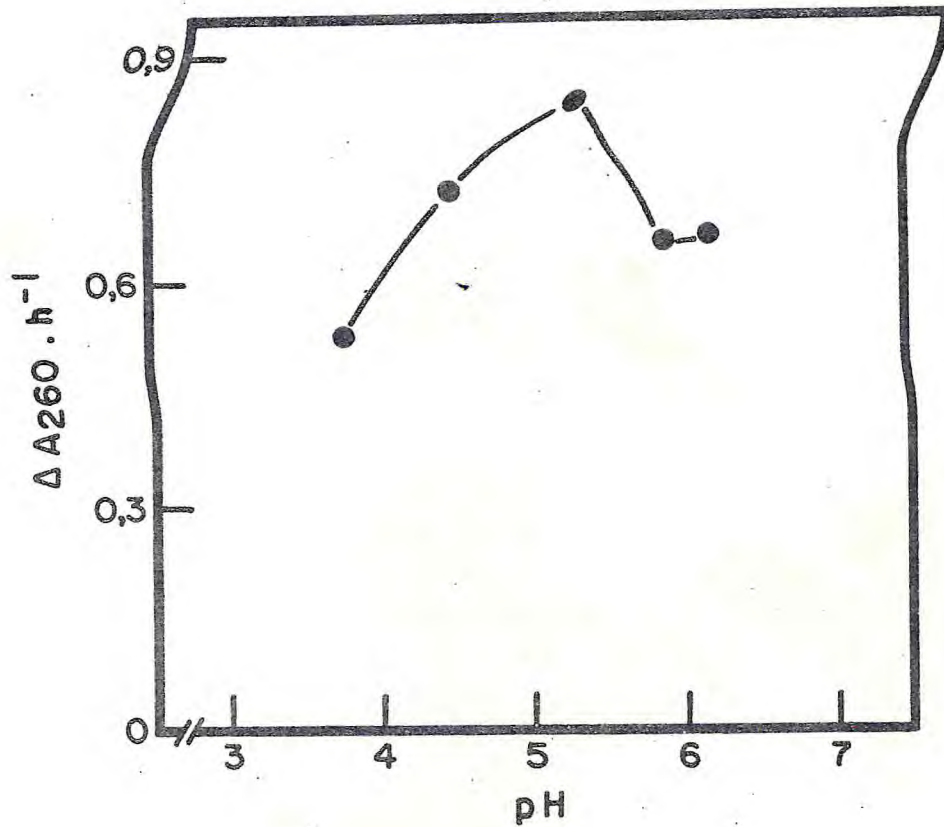


Figura 12 - Variação da atividade ribonucleásica de cotilédones de sementes do feijão de corda seridó (Vigna sinensis (L) Savi) em função do pH.

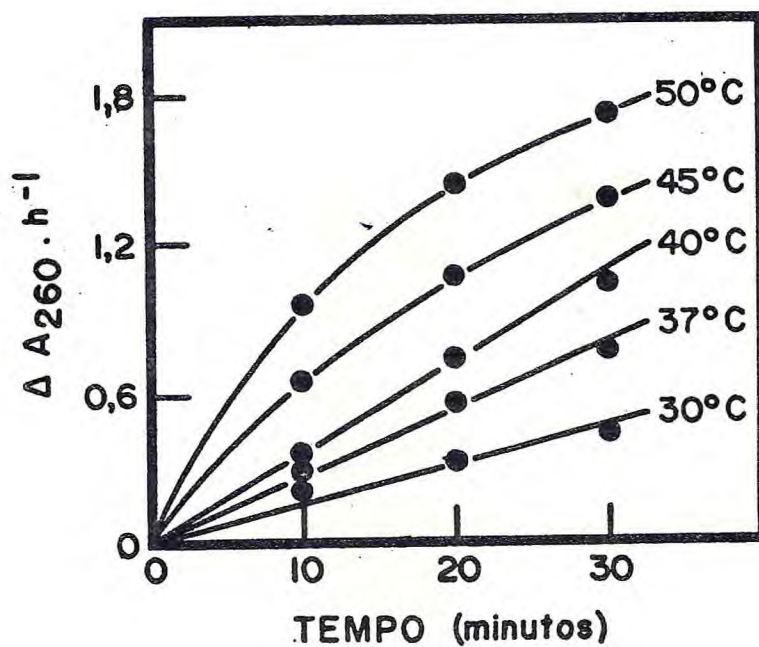


Figura 13 - Variação da atividade ribonucleásica de cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi) em função da temperatura e do tempo de ensaio.

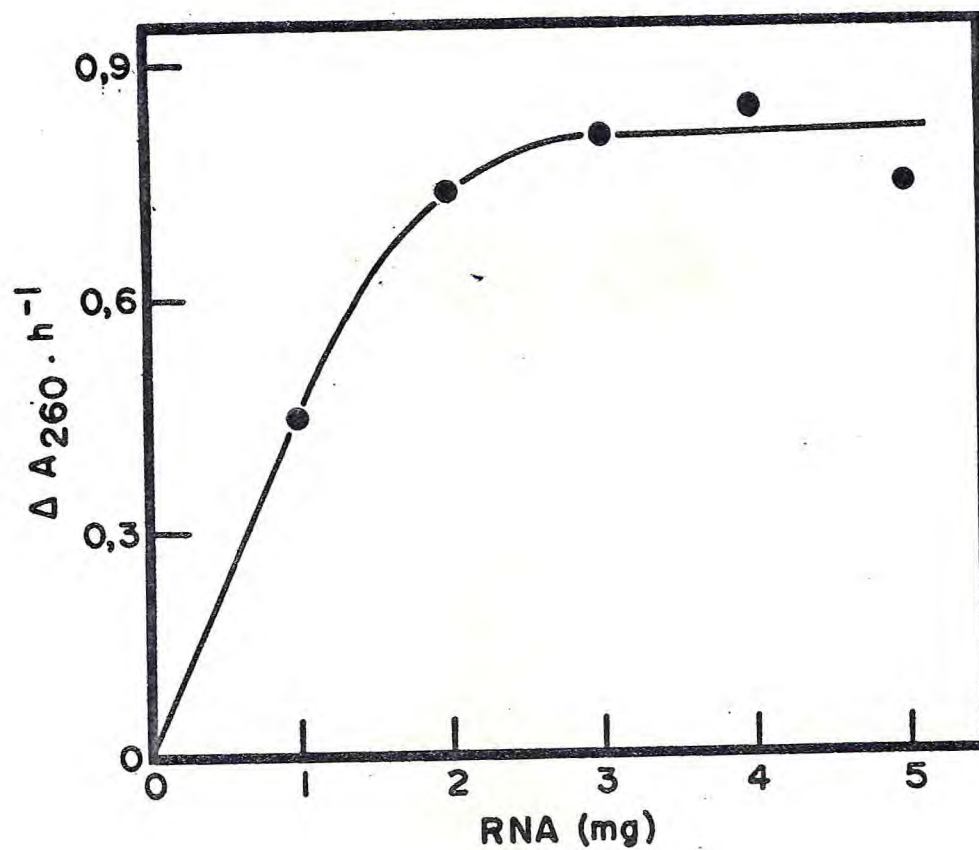


Figura 14 - Variação da atividade ribonucleásica de cotilédones de sementes do feijão de corda seridó (Vigna sinensis (L) Savi) em função da concentração de substrato (RNA).

ção enzima-substrato. Pela curva obtida ficou estabelecida a relação de 3,5mg de substrato (RNA) para 0,2ml do extrato, em um volume total de 2,5ml (Figura 14).

A atividade ribonucleásica total nos cotilédones (Tabela V, Figura 15), de sementes germinadas em solução não salina, cresceu até o quinto dia, quando atingiu o seu valor máximo. Deste dia até o final do experimento ela decresceu uniformemente. Para sementes germinadas em solução salina, a atividade ribonucleásica total aumentou gradativamente até o final da germinação (Tabela V, Figura 15). A atividade específica apresentou valores mais elevados nas sementes germinadas em água do que nas germinadas em solução salina. Esta atividade cresceu no controle, até o quinto dia de germinação, quando permaneceu constante até o final do experimento. Em contraste, a atividade específica em cotilédones de sementes germinadas em solução salina cresceu durante todo o período experimental (Tabela V, Figura 16).

TABELA V. Atividade ribonucleásica total e específica em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C). O potencial de água da solução salina (ψ_{NaCl}) foi de -4,3 bar e o da não salina foi de 0 bar.

Dias de germina ção	Atividade total		Atividade específica	
	(U.A. x cot ⁻¹ x h ⁻¹)		(U.A. x h ⁻¹ x mg prot ⁻¹)	
	C	S	C	S
0	1818,0	1818,0	270,0	270,0
1	5730,0	4704,0	645,0	570,0
3	8760,0	6583,5	1080,0	690,0
5	14760,0	9993,5	2215,0	1080,0
7	12690,0	11376,0	2226,0	1320,0
9	9035,0	13750,5	2152,5	1605,0

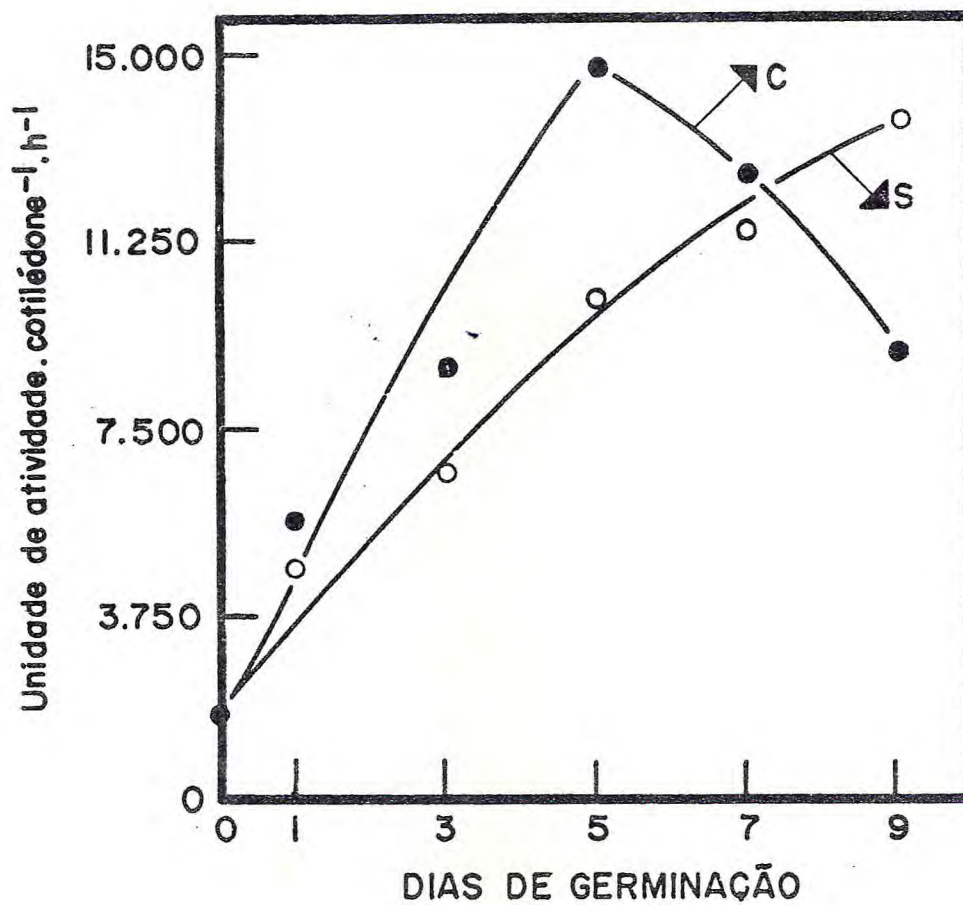


Figura 15 - Atividade ribonucleásica total em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

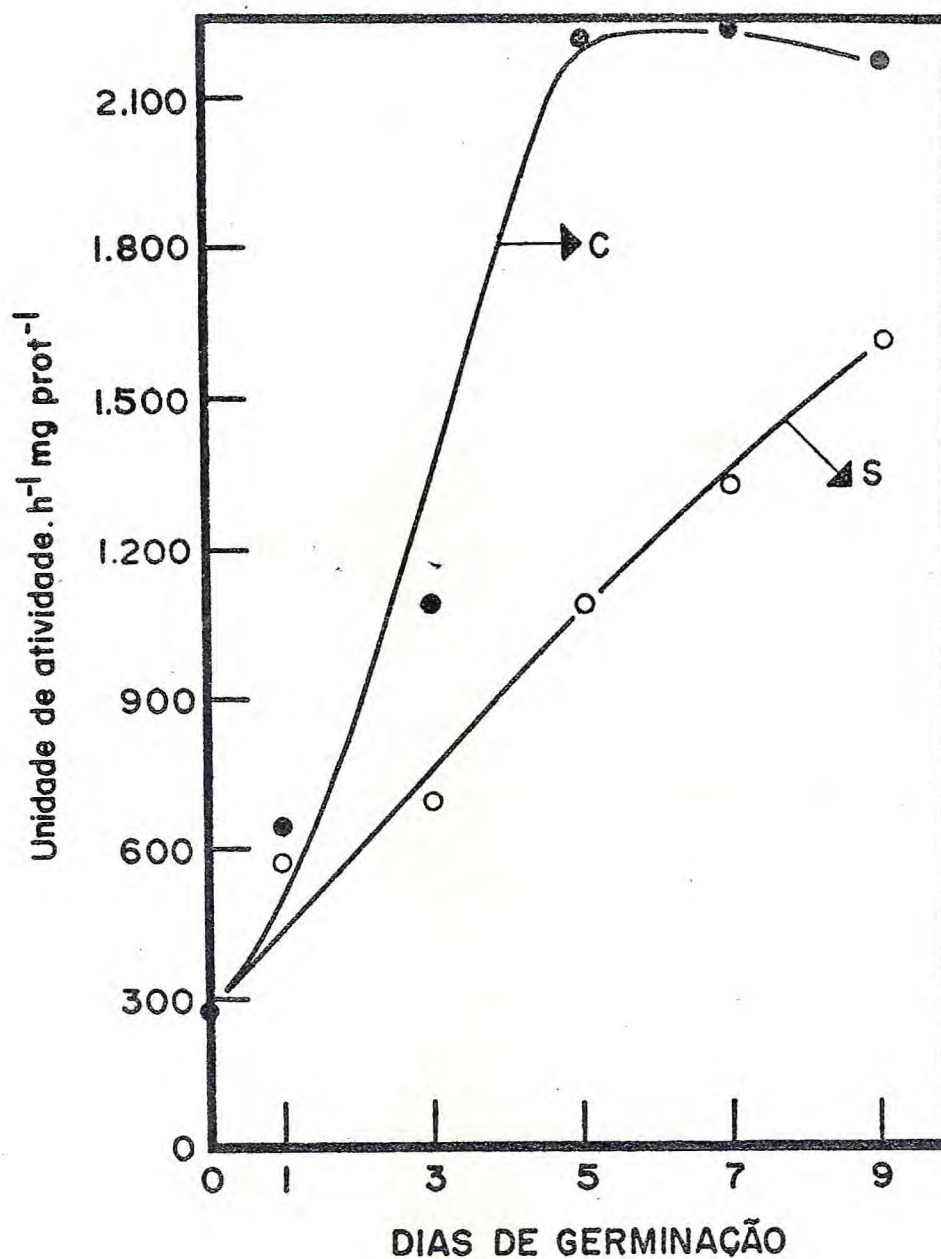


Figura 16 - Atividade ribonucleásica específica em cotilédones de sementes do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L) Savi) germinadas em solução salina (S) e não salina (C).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O efeito inibitório de vários compostos químicos, em particular do NaCl, sobre a germinação de sementes, tem sido observado por vários pesquisadores (Uhvits, 1946; Manohar & Heydecker, 1964; Manohar, 1966; Ungar, 1967). Este efeito, em sementes do feijão de corda seridô (Vigna sinensis (L) Savi), foi tanto maior quanto maior foi a concentração de NaCl usado (Tabela I, Figuras 1 e 2). Isto pode ser explicado, tendo em vista que o aumento da salinidade provoca um abaixamento do potencial de água da solução externa (Black, 1968) acarretando uma diminuição da absorção de água e conseqüentemente a redução da velocidade e percentagem de germinação (Prisco & O'Leary, 1970a). O aumento da salinidade no meio externo também favorece uma maior absorção de sal, possibilitando, em conseqüência, a manutenção do gradiente de potencial de água entre a semente e o meio (Bernstein, 1961, 1963). Este ajustamento osmótico da semente pode ter efeitos diversos no metabolismo e conseqüente desenvolvimento da plântula. Em baixo nível salino (-1 bar), a quantidade de sal absorvida parece ter tido um efeito promotor no metabolismo da semente, evidenciado pelo maior desenvolvimento da plântula (Tabela I, Figura 2), enquanto que, em altos níveis de NaCl, ela parece ter tido efeito oposto. O decréscimo na percentagem de germinação e no tamanho das plântulas observado a medida que o ψ_{NaCl} diminui (Tabela I, Figura 1 e 2) está de acordo com a literatura estudada (Uhvits, 1946; Strogonov, 1964; Prisco & O'Leary, 1970a).

O comportamento das proteínas cotiledonárias das sementes germinadas em solução não salina (Tabela II, Figuras 3, 4 e 5) foi semelhante ao encontrado por Ainouz et al (1972) em sementes da mesma espécie e por Oota et al (1953) em sementes de Vigna sesquipedalis. O decréscimo contínuo das frações

proteicas total, insolúvel e solúvel, foi coerente com o fato, já conhecido, de que durante a germinação de sementes há uma hidrólise das proteínas de reserva em compostos menores que são translocados dos órgãos de reserva para as zonas de crescimento, quando, então, são utilizados para a síntese de novos compostos (Beever, 1968). Para sementes germinadas em condições salinas, estas frações proteicas (Tabela II, Figuras 3, 4 e 5), embora tenham decrescido durante a germinação, este decréscimo ocorreu bem mais suavemente do que nas sementes germinadas em condições não salinas. Isto indica um efeito inibitório do NaCl na mobilização das reservas proteicas da semente. O aumento gradativo do N-amino solúvel dos cotilédones até o sétimo dia no tratamento salino, pode ser interpretado como o resultado da inibição da translocação dos produtos de hidrólise dos cotilédones para o eixo. Por outro lado, o aumento de N-amino solúvel até o terceiro dia, com posterior decréscimo, em sementes germinadas em solução não salina (Tabela II, Figura 6), evidencia a intensa hidrólise das proteínas, bem como o transporte do material hidrolizado. Este comportamento foi também constatado por Yomo & Srinivasan (1973) em cotilédones de Phaseolus vulgaris.

Durante a germinação, as proteínas de reserva são quebradas por enzimas proteolíticas em compostos menores (ácidos aminados e/ou peptídeos) que são translocados para zonas de crescimento (Soedigdo & Gruber, 1960). A mobilização de reservas proteolíticas em sementes durante a germinação foi estudada em espécies diferentes e por vários autores (Marcus & Feeley, 1965; Beever, 1968; Kahane & Poljakoff-Mayber, 1968; Cruz et al, 1970; Palmiano & Juliano, 1972; Yomo & Srinivasan, 1973; Harvey & Oaks, 1974), sendo o comportamento das enzimas proteolíticas durante o processo germinativo uma função da espécie e das condições de germinação. Henshall & Goodwin (1964) encontraram pequenas variações na atividade proteolítica em

cotilédones de sementes de ervilha durante a germinação, já Irving & Fontaine (1945) observaram um aumento constante da atividade em sementes de amendoim, enquanto que Wiley & Ashton (1967) determinaram que em Curcubita maxima há um aumento da atividade proteolítica até o terceiro dia de germinação, se guido por um declínio. O aparecimento de um máximo na atividade proteolítica em sementes do feijão de corda seridô germinadas em solução não salina (Tabela III, Figura 7) está em de sacordo com os estudos de Beevers (1968) em sementes de amen doim que obteve resultados semelhantes aos de Irving & Fontaine (1945). Nossos dados estão de acordo com os resultados obti dos com a mesma espécie (Ainòuz et al, 1972) e com arroz (Cruz et al, 1970). Este aumento até um valor máximo, sugere uma a tivação das proteases pré-existentes nas sementes secas ou síntese de nov o destas enzimas, motivadas pela absorção de água.

O declínio dessa atividade a partir do 5º dia de germinação estaria relacionado com a própria diminuição das pro teínas cotiledonárias, as quais mostraram-se decrescentes ao longo da germinação (Tabela II, Figuras 3, 4 e 5). Além dis to, e tendo em vista que, durante a germinação há síntese de inúmeras enzimas (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1963), é possível que esta queda em atividade esteja relacionada com a diminui ção de síntese de protease, uma vez que o início do declínio da atividade ocorre no mesmo dia que se iniciou o declínio do N-amino solúvel (Tabela X, Figura 6). Para sementes germina das em solução salina, embora tenha havido efeito inibitório do NaCl sobre a mobilização das reservas proteicas da semente (Tabela II, Figuras 3, 4 e 5), esta inibição não pode ser cor relacionada com a atividade proteolítica (Tabela III, Figura 7). Quando muito, podemos admitir que a salinidade provo ca uma ligeira inibição da atividade proteolítica nos primeiros 5 dias de germinação, no caso da protease 6,0. A compara ção

dos valores de atividade específica nos dois tratamentos (Tabela III, Figura 8) parece, a primeira vista, ser contraditório com o que acabamos de afirmar, pois esta atividade é inibida pela salinidade. Esta inibição é devida não a uma diminuição em atividade enzimática causada pelo sal, mas a um maior teor de proteínas existente nos cotilédones das sementes germinadas em solução salina (Tabela II, Figuras 3, 4 e 5), obtendo-se, como consequência, menores valores de atividade específica neste tratamento. Os dados obtidos sugerem que o efeito inibitório da salinidade na mobilização das reservas proteicas da semente está mais relacionado com a inibição da translocação dos produtos de hidrólise do que com a inibição da atividade proteolítica. O acúmulo dos produtos de hidrólise, portanto, poderia afetar a mobilização das reservas, baseado, simplesmente, na lei de ação das massas.

O comportamento dos ácidos nucleicos em cotilédones de sementes em germinação tem sido muito controvertido, isto porque há uma diversificação deste comportamento, dependendo da espécie considerada e das condições de germinação. Em sementes de feijão de corda seridô (Vigna sinensis) germinadas em condições não salinas, os teores de ácidos nucleicos totais e RNA (Tabela IV, Figuras 9 e 11) decresceram ao longo da germinação até o último dia do experimento. O teor de ácido desoxirribonucleico (DNA) permaneceu mais ou menos constante até o terceiro dia de germinação, quando então experimentou um decréscimo até o final do experimento (Tabela IV, Figura 10). Isto mostra que durante o processo germinativo os ácidos nucleicos dos cotilédones da citada espécie parecem ser hidrolizados a compostos mais simples, como mononucleotídeos (Barker & Hollinshead, 1967; Tuve & Anfinsen, 1960; Markham & Strominger, 1956). O comportamento apresentado pelos ácidos nucleicos totais do feijão de corda seridô está de acordo com aquele encontrado por Oota et al. (1953) em Vigna sesquiped-

lis. Como os ácidos nucleicos totais se apresentaram em maior concentração no início da germinação, pode-se estabelecer que os mesmos se encontram estocados na semente seca e que com a embebição de água pela semente as enzimas responsáveis pela mobilização destes compostos são ativadas e iniciam o processo de hidrólise. O nível de RNA (Tabela IV, Figura 11) é inversamente proporcional a atividade ribonucleásica (Tabela V, Figura 15) até o quinto dia de germinação. Após este dia a atividade ribonucleásica declina. Um pico máximo de atividade no quinto dia de germinação também foi encontrado por Barker & Hollinshead (1967) em cotilédones de Pisum arvense. Entretanto, após um declínio até o oitavo dia de germinação, experimentou nova ascensão. O comportamento do sistema RNA-RNase, no presente estudo, parece indicar uma ativação e, possivelmente, síntese de ribonuclease até o quinto dia de germinação, período em que sua atividade é máxima. Entretanto, como os produtos de hidrólise vão sendo transportados para as zonas de crescimento da plântula, a síntese de ribonuclease seria impedida, refletindo-se, conseqüentemente, na sua atividade. Isto é fortalecido pelo comportamento da atividade específica (Tabela V, Figura 16), que se mostra crescente até o quinto dia de germinação para, em seguida, permanecer constante.

O comportamento dos ácidos nucleicos totais, RNA, DNA (Tabela IV, Figuras 9, 10 e 11) e da atividade ribonucleásica (Tabela V, Figuras 15 e 16), para as sementes germinadas em solução salina, foi bastante diferente daquele observado em sementes germinadas em água. A ação do NaCl parece inibir a atividade e/ou síntese de ribonuclease. Isto ocorre principalmente a partir do terceiro dia de germinação, quando o nível de RNA permanece constante. O fato de que a atividade ribonucleásica permaneceu crescendo ao longo do experimento, sugeriria que o NaCl agiu retardando a ativação e/ou síntese desta enzima, o que justificaria os níveis mais baixos da atividade específica (Tabela V, Figura 16) para as sementes ger

minadas em solução salina.

A ribonuclease tem sido estudada em várias espécies de vegetais (Kessler & Engelberg, 1962; Tuve & Anfinsen, 1960; Frisch-Niggemeyer & Reddi, 1957; Shuster, 1957) e as propriedades da enzima do feijão de corda seridô parecem muito semelhantes às de enzimas encontradas em outras espécies. O pH-ótimo, entre 5,0 e 6,0 (Figura 12), encontrado para a ribonuclease de Vigna sinensis (L) Savi é comparável com os valores de pH-ótimo citados para a ribonuclease da folha de ervilha (Holden & Pirie, 1955), da folha de fumo (Frisch-Niggemeyer & Reddi, 1957) e de espinafre (Tuve & Anfinsen, 1960). Vieira et al. (1972) encontraram dois máximos de pH, um em 5,0 e outro em 6,0, para esta mesma espécie, sugerindo a existência de duas ribonucleases. Todavia, no presente estudo, o mesmo não ocorreu, sendo possível que esta discrepância seja devida ao fato dos citados autores terem usado extrato purificado, enquanto que, neste trabalho, foi usado extrato bruto. A temperatura, o tempo de ensaio e a relação enzima-substrato (Figuras 13 e 14) foram, basicamente, semelhantes aos usados para outras ribonucleases vegetais (Shuster, 1957; Tuve & Anfinsen, 1960).

LITERATURA CITADA

- Ainouz, I. L., J. Xavier Filho & E. Gomes Filho. 1972. Atividade proteolítica em sementes de Vigna sinensis cv seridô. Cienc. e Cult., 24: 104.
- Altschul, A. M., L. Y. Yatsu, R. L. Ory & E. M. Engleman. 1966. Seed proteins. Ann. Rev. Plant Physiol., 17:113-136.
- Barker, G. R. & J.A. Hollinshead. 1967. The degradation of ribonucleic acid in the cotyledons of Pisum arvense. Biochem. J., 103: 203 - 237.
- Beevers, L. 1968. Protein degradation and proteolytic activity in the cotyledons of germinating pea seeds (Pisum sativum). Phytochemistry, 77: 1837 - 1844.
- Bernstein, L. 1961. Osmotic adjustment of plants to saline media. I. Steady state. Amer. J. Bot., 48: 909 - 918.
- Bernstein, L. 1963. Osmotic adjustment of plants to saline media. II. Dynamic phase. Amer. J. Bot., 50: 360 - 370.
- Black, C. A. 1968. Soil-Plant Relationships. John Wiley & Sons, 792 p.
- Cherry, J. H. 1962. Nucleic acid determination in storage tissues of higher plants. Plant Physiol., 37:670-678.
- Crestifield, A. M., K. C. Smith & F. W. Allen. 1960. The preparation and characterization of ribonucleic acids from yeast. J. Biol. Chem., 216 : 185 - 193.
- Cruz, L. J., G. B. Cagampang & B. O. Juliano. 1970. Biochemical factors affecting protein accumulation in rice grain. Plant Physiol., 46 : 743 - 747.
- Federov, B. V. 1954. Korennaya Meliorizatsiya zasolenykh i zabolochenykh zemel. Trudy Shestoi Sessii Akademii

- Nauk Turkmenskoi S.S.S.R. Citado em Strogonov, B. P. 1964. Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants. Traduzido do Russo por A. Poljakoff-Mayber & A. M. Mayer, Israel Program for Scientific Translations Ltd., 279 p.
- Frisch - Niggemeyer, W. & K. K. Reddi. 1957. Studies on ribonuclease in tobacco leaves I. Purification and properties. Biochem. Biophys. Acta, 26 : 40 - 46.
- Ghetie, V. 1966. A hypothesis on the mechanism of reserve proteins hydrolysis during seed germination. Rev. Roum. Biochim., 3 : 353 - 361.
- Goa, J. 1953. A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5 : 218-222.
- Greenway, H. & C. B. Osmond. 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. Plant Physiol., 49 : 256 - 259.
- Guardiola, J. L. & J. F. Sutcliffe. 1971. Control of protein hydrolysis in the cotyledons of germinating pea (Pisum sativum L.) seeds. Ann. Bot., 35 : 791 - 807.
- Harvey, B. M. R. & A. Oaks. 1974. The hydrolysis of endosperm protein in Zea mays. Plant Physiol., 53 : 453 - 457.
- Hason - Porath, E. & A. Poljakoff-Mayber. 1969. The effect of salinity on malic dehydrogenase of pea roots. Plant Physiol., 44 : 1031 - 1034.
- Henshall, J. D. & T. W. Goodwin. 1964. Amino acid activating enzymes in germinating pea seedlings. Phytochemistry 3 : 677 - 691.
- Irving, G. W. Jr. & T. D. Fontaine. 1945. Purification and properties of arachain, a newly discovered proteolytic enzyme of the peanut. Arch. Biochem. Biophys., 6 : 351 - 364.

- Kabarrov, V. V. & L. N. Aziyashvili. 1967. Variation of nucleic acid metabolism under salinization conditions. Fiziol. Rast. (Soviet Plant Physiol.), 14 : 719 - 726.
- Kahane, I. & A. Poljakoff-Mayber. 1968. Effect of substrate salinity on the ability for protein synthesis in pea roots. Plant Physiol., 43 : 1115 - 1119.
- Kessler, B. & N. Engelberg. 1962. Ribonucleic acid and ribonuclease activity in developing leaves. Biochim. Biophys. Acta, 55 : 70 - 82.
- Koller, D., A.M. Mayer, A. Poljakoff-Mayber & S. Klein. 1962. Seed germination. Ann. Rev. Plant Physiol., 13 : 437-464.
- Kovda, V. A. 1937. Solonchaki i Solontsy. Cap. V em "Rasteniya i Soli". Moskva - Leningrad. Izdatel'stvo Akademii Nauk S. S. S. R. Citado em Strogonov, B. P. 1964. Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants. Traduzido do Russo por A. Poljakoff-Mayber & A. M. Mayer, Israel Program for Scientific Translations Ltd., 279 p.
- Ledoux, L., P. Galand & R. Huart. 1962. Nucleic acid and protein metabolism of barley seedlings. I. The parallelism between ribonucleic acid content and ribonuclease activity. Biochim. Biophys Acta, 55 : 97 - 104.
- Lellouch, J. & P. Lazar. 1968. Cours de Statistique Appliquée a la Biologie. 1^{ere} Partie: Les Essais Biologiques. Centre D'Enseignement de la Statistique Appliquée a la Medicine et la Biologie Medicale (C.E.S.A.M.). Paris.
- Lowry, O. H., J. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265 - 275.

- Lyles, L. & C. D. Fanning. 1964. Effects of presoaking, moisture tension, and soil salinity on the emergence of grain sorghum. Agron. J., 56 : 518 - 520.
- Manohar, M. S. 1966. Effect of "osmotic" system on germination of peas (Pisum sativum L). Planta, 71: 81 - 86.
- Manohar, M. S. & W. Heydecker. 1964. Effects of water potential on germination of pea seeds. Nature, 202:22-24.
- Marcus, A. & J. Feeley. 1965. Protein synthesis in imbibed seeds. II. Polysome formation during inhibition. J. Biol. Chem., 240 : 1675 - 1680.
- Marham, R. & J. L. Strominger. 1956. The action of leaf ribonuclease. Biochem. J., 64 : 46.
- Mayer, A. M. & A. Poljakoff-Mayber. 1963. The Germination of Seeds. Pergamon Press, 236 p.
- Oota, Y., R. Fujii & S. Osawa. 1953. Changes in chemical constituents during the germination of a bean, Vigna sesquipedalis. J. Biochem. (Japan), 40 : 649 - 661.
- Palmiano, E. P. & B. O. Juliano. 1972. Biochemical changes in the rice grain during germination. Plant Physiol., 49: 751 - 756.
- Porath, E. & A. Poljakoff-Mayber. 1964. Effect of salinity on metabolic pathways in pea root tips. Israel J. Bot., 13 : 115 - 121.
- Porath, E. & A. Poljakoff-Mayber. 1968. Effect of salinity in the growth medium on carbohydrate metabolism in pea root tips. Plant and Cell Physiol., 9 : 195 - 203.
- Prisco, J. T. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins of salt and water stressed embryonic axis of Phaseolus vulgaris L. seeds during germination. Cienc. Agron., 1 : 47 - 50.

- Prisco, J. T. & J. W. O'Leary. 1970a. Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of Phaseolus vulgaris L. seeds. Turrialba, 20 : 177 - 184.
- Prisco, J. T. & J. W. O'Leary. 1970b. Effect of salt and water stresses on protein synthesizing capacity of embryo-axis of germinating Phaseolus vulgaris L. seeds. Rev. Brasil. Biol., 30 : 317 - 321.
- Prisco, J. T., I. L. Ainouz & S. C. Melo. 1975. Changes in nitrogenous compounds and proteases during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant., 33 : 18 - 21.
- Riley, J. J. 1968. Physiological Response of Plants to Salinity. Ph. D. Dissertation, Univ. of Arizona, Tucson, Arizona, U.S.A. 134 p.
- Shuster, L. 1957. Ryegrass nucleases. J. Biol. Chem., 229 : 289 - 303.
- Soedigdo, R. & M. Gruber. 1960. Purification and some properties of a protease from pea seeds, Pisum sativum L., s. sp. arvense A. and G. Biochim. Biophys. Acta, 44 : 315 - 323.
- Strogonov, B. P. 1964. Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants. Traduzido do Russo por A. Poljakoff-Mayber & A. M. Mayer. Israel Program for Scientific Translations Ltd., 279 p.
- Tuve, T. W. & C. B. Anfinsen. 1960. Preparation and properties of spinach ribonuclease. J. Biol. Chem., 235 : 3437 - 3441.
- Uhvits, R. 1946. Effect of osmotic pressure on water absorption and germination of alfalfa seeds. Amer. J. Bot., 33 : 278 - 285.
- Ungar, I. A. 1967. Influence of salinity and temperature on

- seed germination. Ohio J. Sci., 67 : 120 - 123.
- Vieira, G. H. F., A. R. S. Casimiro, F. A. L. Gondim & F. H. Rola. 1972. Atividade ribonucleásica em "Vigna sinensis". Cienc. e Cult., 24 : 105.
- Weimberg, R. 1967. Effect of sodium chloride of the activity of a soluble malate dehydrogenase from pea seeds. J. Biol. Chem., 242 : 3000 - 3006.
- Weimberg, R. 1970. Enzyme levels in pea seedlings grown on highly salinized media. Plant Physiol., 46 : 466-470.
- Wiggans, S. C. & E. P. Gardner. 1959. Effectiveness of various solutions for simulating drought conditions as measured by germination and seedling growth Agron. J., 51 : 315 - 318.
- Wiley, L. & F. M. Ashton. 1967. Influence of the embryonic axis on protein hydrolysis in cotyledons of Cucurbita maxima. Physiol. Plant., 20 : 688 - 696.
- Yemm, E. W. & E. Cocking. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst, 80 : 209 - 213.
- Yomo, H. & K. Srinivasan. 1973. Protein breakdown and formation of protease in attached and detached cotyledons of Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol., 52 : 671-673.
- Young, J. L. & J. E. Varner. 1959. Enzyme synthesis in the cotyledons of germinating seeds. Arch. Biochim. Biophys., 84 : 71 - 78.
- Young, J. L., R. C. Huang, S. Vanecko, J. D. Marks & J. E. Varner. 1960. Conditions affecting enzyme synthesis in cotyledons of germinating seeds. Plant Physiol., 35 : 288 - 292.