

EFEITOS DA SALINIDADE NA ATIVIDADE DE TRÊS ENZIMAS HIDROLÍTICAS
EXTRAÍDAS DE COTILÉDONES DE FEIJÃO DE CORDA PITIÚBA (VIGNA
SINENSIS (L) SAVI) DURANTE A GERMINAÇÃO

Eneas Gomes Filho

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

FORTALEZA - CEARÁ

1 9 7 6

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.

Eneas Gomes Filho

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

José Tarquínio Prisco
Orientador da Dissertação

Data

José Xavier Filho

Data

Renato de Azevedo Moreira

Data

A meus pais e irmãos,
a minha mulher e filha

AGRADECIMENTOS

De modo especial, somos gratos ao Professor Dr. José Tarquínio Prisco, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela segura orientação prestada na realização desta dissertação, e aos Professores Dr. José Xavier Filho e Dr. Renato de Azevedo Moreira, pelas valiosas sugestões apresentadas durante a execução do presente trabalho.

Estendemos nossos agradecimentos aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização do presente estudo, nas pessoas da Prof.^a Iracema Lima Ainouz, Prof.^a Maria da Guia Silva Lima, Prof. Dr. Luiz Gonzaga Rebouças Ferreira e do Auxiliar de Ensino Joaquim Enéas Filho.

Agradecemos ao Prof. Roberto Cláudio Frota Bezerra, do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada a preciosa contribuição na parte estatística desta dissertação e ao Sr. Carlos Alberto Pontes pela revisão do texto.

Nossos agradecimentos são extensivos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), sem a ajuda dos quais este trabalho não teria sido realizado.

Finalmente, o autor, agradece a seus pais, irmãos e esposa, que embora de modo indireto, prestaram inestimável contribuição.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
INTRODUÇÃO	1
Salinidade	1
Fisiologia e bioquímica do "stress" salino em plantas	2
Germinação de sementes sob condições de "stress" salino	3
Mobilização de reservas nitrogenadas durante a germinação	4
Metabolismo e atividade enzimática sob condições salinas	6
Objetivos do presente trabalho	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Sementes e condições de germinação	11
Medidas do crescimento	12
Atividade enzimática	12
Atividade proteolítica	13
Atividade peptidásica	14
Atividade ribonucleásica	15
Delineamento experimental e análise estatística	16
RESULTADOS	18
Crescimento das plântulas	18
Atividade proteolítica	23
Experimentos <u>in vivo</u>	25
Experimentos <u>in vitro</u>	30

CONTEÚDO (continuação)

	Página
Atividade peptidásica	36
Experimentos <u>in vivo</u>	36
Experimentos <u>in vitro</u>	42
Atividade ribonucleásica	42
Experimentos <u>in vivo</u>	47
Experimentos <u>in vitro</u>	49
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	58
LITERATURA CITADA	67
ANEXO	74

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
I. Peso fresco de cotilédones e eixos embrionários durante a germinação de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).	19
II. Peso seco de cotilédones e eixos embrionários durante a germinação de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	20
III. Atividade proteolítica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	26
IV. Atividade proteolítica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) em função de quantidades crescentes de NaCl na mistura de reação.....	31
V. Atividade peptidásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	39
VI. Atividade peptidásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) em função de quantidades crescentes de NaCl na mistura de reação.....	43
VII. Atividade ribonucleásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	50

LISTA DE TABELAS (continuação)

Tabela	Página
VIII. Atividade ribonucleásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) em função de quantidades crescentes de NaCl na mistura de reação.....	54
IX. Estimativa dos quadrados médios dos resultados apresentados nas Tabelas I e II, tendo por base um delineamento hierárquico com dois fatores, sendo o número de repetições igual a 3.....	75
X. Estimativa dos quadrados médios dos resultados apresentados nas Tabelas III, V e VII, tendo por base um delineamento hierárquico com dois fatores, sendo o número de repetições igual a 3.....	76
XI. Estimativa dos quadrados médios do erro dos resultados apresentados nas Tabelas IV, VI e VIII, tendo por base um delineamento inteiramente ao acaso, sendo o número de repetições igual a 3.	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
1. Peso fresco de cotilédones e eixos embrionários durante a germinação de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	21
2. Peso seco de cotilédones e eixos embrionários durante a germinação de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	22
3. Características da protease 6,0 extraída de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	24
4. Atividade proteolítica total de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	27
5. Atividade proteolítica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).	28
6. Concentração de proteína em extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	29
7. Atividade proteolítica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação.....	32

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

Figura	Página
8. Efeito do NaCl sobre os produtos de hidrólise da protease 6,0 extraída de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	33
9. Efeito da presença de EDTA na mistura de reação sobre a atividade proteolítica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	34
10. Leituras em 750 nm dos produtos da reação com o reagente de Folin em ausência e presença de EDTA.....	35
11. Características da LPase extraída de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).	37
12. Atividade peptidásica total de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	40
13. Atividade peptidásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi)....	41
14. Atividade peptidásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

Figura	Página
15. Efeito do NaCl sobre os produtos de hidrólise da LPase extraída de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	45
16. Efeito da presença de EDTA na mistura de reação sobre a atividade peptidásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	46
17. Características da RNase extraída de cotilédones provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) com 5 dias após a semeadura em água destilada.....	48
18. Atividade ribonucleásica total de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi)....	51
19. Atividade ribonucleásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi).....	52
20. Atividade ribonucleásica específica de extratos de cotilédones provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi) com 5 dias após a semeadura em água destilada, em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação.....	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

Figura	Página
21. Efeito do NaCl sobre os produtos de hidrólise da RNase extraída de cotilédones provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi), com 5 dias após a semeadura em água destilada.....	56
22. Efeito da presença de EDTA na mistura de reação sobre a atividade ribonucleásica específica de extratos de cotilédones provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba (<u>Vigna sinensis</u> (L) Savi), com 5 dias após a semeadura em água destilada.....	57

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

A_{260}	- absorbância medida em 260 nm.
ΔA_{260}	- diferença de absorbância medida em 260 nm.
A_{410}	- absorbância medida em 410 nm.
ΔA_{410}	- diferença de absorbância medida em 410 nm.
A_{750}	- absorbância medida em 750 nm.
ΔA_{750}	- diferença de absorbância medida em 750 nm.
DNA	- ácido desoxirribonucleico.
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético.
I	- força iônica.
LPA	- L-leucina p-nitroanilida.
LPase	- enzima capaz de promover a hidrólise da L-leucina p-nitroanilida.
NBCo	- Nutritional Biochemical Corporation.
Protease 6,0	- enzima capaz de promover a hidrólise da caseína a pH 6,0.
RNA	- ácido ribonucleico.
RNase	- enzima capaz de promover a hidrólise do ácido ribonucleico.
UA	- unidade de atividade.

RESUMO

O presente estudo trata da ação do NaCl no processo germinativo e na atividade de 3 enzimas hidrolíticas envolvidas na mobilização das reservas nitrogenadas, em sementes de feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi).

Estudou-se o efeito do NaCl no processo germinativo através de medidas de peso fresco e seco de cotilédones e eixos embrionários, provenientes de sementes semeadas em água destilada (tratamento controle) e em solução de NaCl 0,1 M (tratamento salino). Foi observado que a presença do sal no meio de germinação inibe a mobilização e/ou transporte das reservas cotiledonárias para o eixo embrionário.

As enzimas hidrolíticas foram estudadas a pH 6,0 (protease), pH 7,0 (LPase) e a pH 5,2 (RNase), usando-se como substrato caseína, LPA e RNA, respectivamente. O efeito do NaCl nas atividades enzimáticas foi estudado in vivo e in vitro. As análises in vivo foram feitas em extratos de cotilédones provenientes de sementes dos tratamentos controle e salino, ao longo da germinação. Os experimentos in vitro foram realizados em extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes (protease e LPase) ou em extratos de cotilédones, obtidos de plântulas do tratamento controle, após 5 dias da semeadura (RNase). A atividade proteolítica in vivo praticamente não foi afetada pela salinidade, enquanto que, in vitro, a mesma concentração de sal (NaCl 0,1 M) causou um efeito inibitório. Os resultados indicam que a ação inibitória do NaCl na mobilização das reservas protéicas não se faz através de seus efeitos sobre a protease 6,0. Nos experimentos in vivo foi observado que a LPase é uma enzima que é degradada logo que o processo germinativo é iniciado, e que a velocidade de degradação desta enzima é menor sob condições

salinas. Embora in vitro o mesmo nível de sal (NaCl 0,1 M) tenha estimulado a atividade da LPase, parece que não se pode atribuir a isto os valores de atividade mais elevados, encontrados in vivo para o tratamento salino. Os resultados sugerem que a salinidade in vivo inibe a ação do sistema enzimático responsável pela degradação da LPase. O NaCl in vivo teve um efeito inibitório sobre a atividade da RNase. Todavia, in vitro, usando-se o mesmo nível de sal (NaCl 0,1 M), praticamente não foi observado nenhum efeito sobre a atividade desta enzima. Os resultados sugerem que o efeito inibitório do NaCl in vivo deve-se a ação deste sal na ativação e/ou síntese de novo da RNase.

INTRODUÇÃO

Salinidade

Um solo é considerado salino quando contém sais solúveis em quantidades suficientes para prejudicar o crescimento das plantas, tornando, conseqüentemente, baixa a sua produtividade. Nos Estados Unidos, considera-se um solo como salino quando a condutividade do seu extrato de saturação é igual ou superior a $4 \text{ mmho} \times \text{cm}^{-1}$ (Richards, 1954). Os sais solúveis que compõem os solos salinos são constituídos, principalmente, pelos cátions de sódio, cálcio e magnésio, e pelos ânions sulfato e cloreto. Outros íons, tais como potássio, bicarbonato, carbonato e nitrato, ocorrem em pequenas quantidades (Richards, 1954). Normalmente, tais solos se localizam em regiões de climas áridos ou semi-áridos, onde não existem precipitações pluviométricas capazes de os lixiviar suficientemente. Associado a este fator climático desfavorável, nessas regiões predominam altas velocidades de evaporação, o que faz com que a concentração de sais no solo e na água se torne mais elevada (Richards, 1954).

O problema da salinidade tem atraído a atenção de muitos governos interessados em minorar os prejuízos para a economia, causados pelos baixos rendimentos dos solos salinos. A União Soviética, por exemplo, possui cerca de 10% de sua área constituída por solos salinos (Kovda, 1937). Nos Estados Unidos, a salinidade reduz em mais de 25% a produção de suas áreas irrigadas (Black, 1968). Em algumas regiões da Ásia Central, este problema é maior, pois 89% de sua área total de irrigação corresponde a solos pantanosos e salinos (Fedorov, 1954). No Nordeste brasileiro, apesar da falta de dados precisos, acredita-se que grande parte de sua área de irrigação esteja salinizada ou em vias de salinização. Esta

crença é fundamentada pelas condições climáticas desfavoráveis que o Nordeste brasileiro, região-semiárida, apresenta, reforçada pelo deficiente sistema de drenagem existente. Pizarro (1975) estima que 1/5 das áreas irrigadas do Nordeste estão salinizadas.

Fisiologia e bioquímica do "stress" salino em plantas

Do exposto, é evidente que se procure uma solução para o problema da salinidade. Uma maneira de resolver tal problema seria através da recuperação dos solos inutilizados ou em vias de inutilização. Todavia, isto envolveria grandes investimentos e somente em determinadas circunstâncias poderá ser economicamente viável (Strogonov, 1964; Black, 1968). Carter (1975) acha que só compensa recuperar um solo salino se os custos envolvidos na recuperação não aumentarem demasiadamente os custos de produção. Contudo, considerações de ordem político-social muitas vezes justificam a recuperação de um solo, mesmo sem atender o lado econômico enfatizado por Carter (1975). Uma outra opção seria o desenvolvimento de pesquisas no sentido de se conseguir plantas que fossem resistentes ou tolerantes ao excesso de sais. Para conseguir este intento, é necessário primeiro que se conheça a fisiologia e bioquímica das plantas sob condições de "stress" salino. Neste caso, deve-se dar ênfase primordial ao estudo da germinação de sementes sob condições de "stress" salino, não só por ser esta a etapa inicial do processo de formação de qualquer cultura, como também pelo fato de se conhecer que determinadas espécies são bastantes tolerantes aos sais durante o crescimento, mas são extremamente sensíveis durante a germinação (Ayers et al., 1952; Richards, 1954).

Germinação de sementes sob condições de "stress" salino

Os efeitos da salinidade sobre a germinação das sementes foram, por muito tempo, explicados pela teoria da "seca fisiológica". Esta teoria se apoia no fato de que os sais solúveis aumentam a pressão osmótica da solução do solo, acarretando, como consequência, uma redução no gradiente de potencial hídrico entre a semente e o solo. Como resultado, menor seria a absorção de água pela semente, e, em consequência, o processo germinativo seria inibido (Strogonov, 1964).

Todavia, há cerca de 30 anos atrás começaram a surgir os primeiros experimentos que demonstravam que os sais tinham também efeitos tóxicos para as sementes. Um dos mais célebres estudos neste sentido foi realizado com sementes de alfafa por Uhvits (1946). Ela estudou a germinação desta espécie em soluções de manitol (soluto não iônico) e NaCl (soluto iônico), em concentrações iso-osmóticas (12 e 15 atm), e observou que a germinação era inibida por tais substâncias, sendo que o NaCl tinha um efeito mais drástico que o manitol. Além disso, ela demonstrou que as sementes que não germinaram em altas concentrações de NaCl ou de manitol, ao serem transferidas para água destilada, possuíam uma capacidade residual de germinação. Contudo, tal recuperação em germinação foi muito maior para as sementes provenientes do tratamento com manitol do que com NaCl, sugerindo, portanto, que a semente absorve íons em quantidades capazes de promover um efeito tóxico. Resultados semelhantes aos de Uhvits (1946) foram encontrados por Wiggans & Gardner (1959) com sementes de Raphanus sativus e de sorgo semeadas em soluções de NaCl, glicose, sacarose, manitol ou polivinil-pirrolidona. Strogonov (1964), no entanto, afirma que não se pode explicar a inibição do processo germinativo somente pela alta pressão osmótica da solução do solo. Ele mostrou que sementes de algodão previamente embebidas e postas a germinar num solo salino não o faziam

mesmo após 3 meses. Isto foi interpretado como sendo devido aos efeitos tóxicos dos sais.

Acredita-se que os efeitos osmóticos do sal, especialmente do NaCl, no processo germinativo, predominem quando a concentração salina é baixa, enquanto que os efeitos tóxicos predominam em elevadas concentrações de sais. Pesquisas neste sentido foram desenvolvidas por Prisco & O'Leary (1970a), que conseguiram separar tais efeitos. Seus resultados mostram que, para potenciais hídricos entre 0 e -8 bar, o efeito do NaCl sobre a germinação de Phaseolus vulgaris foi predominantemente osmótico, enquanto que em baixos potenciais hídricos (-12 bar) a inibição da germinação era devida, principalmente, aos efeitos tóxicos do NaCl.

Mobilização de reservas nitrogenadas durante a germinação

A germinação das sementes consiste numa série de eventos morfogênicos, que resultam na transformação do embrião em plântula. No estado quiescente, as sementes se caracterizam por sua baixa atividade metabólica, provavelmente devido ao baixo conteúdo de água (5 a 10%) normalmente observado (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1963). À medida que a semente absorve água, a atividade metabólica aumenta e tem início o processo germinativo. Paralelamente à absorção de água, ocorre a hidrólise das substâncias de reserva e o simultâneo transporte dos produtos de hidrólise para o eixo embrionário (Beevers, 1968; Ching, 1972).

A mobilização das proteínas de reserva foi estudada em ervilha (Lawrence et al.; 1959; Beevers & Guernsey, 1966; Beevers & Splittstoesser, 1968), arroz (Palmiano & Juliano, 1972), soja (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1963), cevada (Prentice et al., 1969), Vigna sinensis (Prisco et al., 1975), Phaseolus vulgaris (Simon & Meany, 1965; Pusztai & Duncan, 1971), Vigna

radiata (Chrispeels & Boulter, 1975; Harris & Chrispeels, 1975) e abóbora (Wiley & Ashton, 1967).

A degradação das proteínas de reserva é efetuada por dois grandes grupos de enzimas hidrolíticas: as proteases e as peptidases. As primeiras promovem a hidrólise dessas proteínas a peptídios ou a aminoácidos, enquanto que as peptidases promovem a hidrólise dos peptídios a aminoácidos. Estudos da atividade proteolítica durante a germinação mostram que para determinadas espécies, ela aumenta (Beevers & Splittstoesser, 1968); em outras, a atividade proteolítica não mostra nenhuma tendência característica (Burger & Siegelman, 1966; Pusztai & Duncan, 1971), e, finalmente, existe um terceiro grupo de espécies em que a atividade proteolítica aumenta com a germinação até atingir um valor máximo para daí em diante decrescer (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1963; Wiley & Ashton, 1967; Prisco et al., 1975). Beevers & Splittstoesser (1968) mostraram que a atividade proteolítica nos cotilédones de ervilha aumenta, principalmente, depois que a maioria das reservas protéicas tiver sido mobilizada. Em contraste, a atividade peptidásica, inicialmente alta, declina à medida que as proteínas cotiledonárias diminuem. Eles interpretaram estes resultados como indicação de que as peptidases estão mais intimamente associadas com a degradação das proteínas de reserva do que as proteases. Todavia, a presença de atividade peptidásica no eixo embrionário, desprovido de reserva protéica, indica que estas enzimas não estão associadas somente com a degradação, mas também com a utilização das reservas de proteínas. Os resultados encontrados por Prentice et al. (1969), em cevada, reforçam a hipótese lançada por Beevers & Splittstoesser (1968) e sugerem que as peptidases também estão relacionadas com o crescimento e desenvolvimento da plântula. A importância das proteases na mobilização das proteínas de reserva foi também demonstrada por Chrispeels & Boulter (1975), por Harris & Chrispeels (1975) e por Prisco et al. (1975).

↓ Ainda com respeito ao metabolismo protéico, como regra geral, a literatura pertinente ao assunto mostra claramente que a concentração de proteína decresce nos órgãos de reserva e aumenta nas zonas de crescimento (Beever, 1968; Guardiola & Sutcliffe, 1971). Os aminoácidos liberados pela ação das proteases e/ou peptidases, são translocados para o eixo embrionário (Beever, 1968; Prisco et al., 1975) ou usados para a síntese de proteínas enzimáticas nos cotilédones (Young & Varner, 1959; Young et al., 1960).

A mobilização de ácidos nucleicos foi estudada em Vigna sesquipedalis (Oota et al., 1953), Vigna arvense (Barker & Hollinshead, 1967), arroz (Palmiano & Juliano, 1972) e Vigna sinensis (Vieira, 1975). Os resultados mostram que nos órgãos de reserva o conteúdo de ácido ribonucleico (RNA) decresce, enquanto a atividade ribonucleásica se torna crescente durante a germinação. Os nucleotídeos produzidos pela ação da RNase podem ser utilizados na síntese de outros tipos de RNAs, tanto nos órgãos de reserva como no eixo embrionário, ou podem ser usados para outras atividades metabólicas.

Metabolismo e atividade enzimática sob condições salinas

↓ Vários estudos sobre o metabolismo protéico em condições salinas tem registro na literatura. Embora os resultados apresentados demonstrem claramente que os sais alteram o metabolismo, ainda não foi possível explicar como isto ocorre. Strogonov (1964) mostrou que o equilíbrio existente entre as proteínas e os aminoácidos livres é alterado pela salinidade. Kahane & Poljakoff-Mayber (1968) estudaram a absorção e incorporação em proteínas de aminoácidos radioativos, em extremidade de raízes de ervilha sob condições salinas. Como resultado, foi mostrado que a salinidade reduz não só a capacidade destes tecidos de absorverem aminoácidos, como tam

bém a capacidade para incorporar aminoácidos nas proteínas. Resultados semelhantes foram encontrados por Prisco & O'Leary (1970b) em eixos embrionários de Phaseolus vulgaris, usando soluções de NaCl ou Carbowax. Estes autores acham que a inibição da capacidade de síntese protéica, devida ao "stress" salino e hídrico, está correlacionada com o processo de absorção de água. Prisco (1971) acha que a inibição do crescimento do eixo embrionário de Phaseolus vulgaris é o resultado não só de diferenças quantitativas em proteínas, mas também de diferenças qualitativas nas proteínas dos eixos embrionários, em cada situação.

↓ Algumas rotas metabólicas foram analisadas com respeito às suas alterações com a salinidade. Porath & Poljakoff Mayber (1964) estudaram os efeitos do NaCl e do Na₂SO₄ sobre a respiração dos tecidos de extremidades de raízes de ervilha. Usando glicose marcada nos carbonos de números 1 ou 6, elas encontraram que a salinidade diminui o consumo de glicose exógena, além de reduzir a relação entre os carbonos marcados (C₆/C₁), que são liberados para o meio sob a forma de C¹⁴O₂. Foi também encontrado que a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase tem sua atividade in vivo estimulada pelo sal, enquanto que a enzima málico-desidrogenase ao contrário é inibida. Estava por conseguinte claro que a salinidade inibe o ciclo de Krebs e estimula a degradação da glicose através da via pentose-fosfato. Outras enzimas glicolíticas foram estudadas, e, com exceção da glicose-fosfato-isomerase, todas as outras têm suas atividades in vivo inibidas pelo sal (Porath & Poljakoff-Mayber, 1968). No caso da glicose-fosfato-isomerase, a salinidade devida ao sulfato não causa qualquer efeito na atividade dessa enzima, enquanto que a salinidade devida ao cloreto provoca um aumento em atividade de cerca de 10 vezes. Resultados diferentes daqueles encontrados por Porath & Poljakoff-Mayber (1964 e 1968), foram obtidos por Weimberg (1970), ao estudar as atividades de 18 enzimas em plântulas

de ervilha cultivadas em meio fortemente salino. Embora o desenvolvimento das plântulas tenha sido prejudicado pela presença dos sais utilizados no meio de crescimento (NaCl , Na_2SO_4 , MgCl ou K_2SO_4), as atividades específicas das enzimas testadas não foram modificadas.

↓ Vários autores estudaram os efeitos dos sais na atividade in vitro de diversas enzimas (Weimberg, 1967; Greenway & Osmond, 1972; Osmond & Greenway, 1972; Flowers, 1972a e 1972b; Boucaud, 1972; Kalir & Poljakoff-Mayber, 1975; Austenfeld, 1976). Recentemente, esta linha de pesquisas vem sendo bastante explorada e alguns parâmetros fisiológicos, que são modificados pela presença do sal no meio de crescimento da planta, foram esclarecidos com base nestes estudos. Iniciando tais estudos, Evans & Sorger (1966) observaram que íons monovalentes afetavam as atividades de diversas enzimas. Weimberg (1967) propôs uma explicação para o fenômeno do ajustamento osmótico das plantas crescendo em meio salino através dos efeitos do NaCl na atividade da enzima málico-desidrogenase extraída de sementes de ervilha. Ele observou que a atividade desta enzima, na conversão do ácido oxaloacético a ácido málico, aumentava à medida que a concentração de sal crescia até 0,02 M. Todavia, para valores superiores a este, a enzima tinha sua atividade diminuída. Admitindo que o comportamento in vivo desta enzima seja o mesmo que o encontrado in vitro, ele sugeriu que o sal, ao inibir a málico-desidrogenase, faz com que o ácido oxaloacético, formado pela fixação do CO_2 , se acumule. Este acúmulo em ácido oxaloacético, possivelmente, causaria um bloqueio no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, pois a enzima succinato desidrogenase é inibida por tal composto. Como consequência disso, haveria um acúmulo de ácidos orgânicos nos tecidos. Outra possibilidade seria a posterior transformação do oxaloacetato em aspartato, o que concordaria com as observações experimentais feitas por Webb & Burley (1965), de que as halófitas obrigatórias produzem com

parativamente mais aminoácidos do que as não obrigatórias. Além disso, eles demonstraram que Spartina alterniflora, uma halófita facultativa, produzia mais aminoácidos quando era cultivada sob condições de salinidade.

Contudo, nem sempre os resultados encontrados in vitro concordam com as observações feitas in vivo. Um exemplo disto foi apresentado por Greenway & Osmond (1972), ao estudarem os efeitos in vitro do NaCl nas atividades das enzimas málico-desidrogenase, aspartato-transaminase, glicose-6-fosfato-desidrogenase e isocitrato-desidrogenase, extraídas de glicófitas (Phaseolus vulgaris) e de halófitas (Atriplex spongiosa e Salicornia australis). Eles encontraram que baixas concentrações de sal, in vitro, usualmente estimulavam a atividade enzimática, enquanto que altas concentrações tinham efeitos inibitórios. Tanto as enzimas extraídas de glicófitas como aquelas extraídas de halófitas mostraram igual sensibilidade ao NaCl. Todavia, quando as plantas são cultivadas em meio salino e as atividades das enzimas são estudadas, não há modificações em suas atividades específicas. Como vemos, estes resultados são concordantes com aqueles encontrados por Weimberg (1967 e 1970), porém diferem dos obtidos por Porath & Poljakoff-Mayber (1964 e 1968). Resultados surpreendentes são encontrados quando se tenta correlacionar a sensibilidade ao sal, in vitro, entre enzimas extraídas de espécies diferindo em tolerância ao sal. Por exemplo, Osmond & Greenway (1972) encontraram que a enzima fosfoenolpiruvato-carboxilase, obtida de Atriplex spongiosa, uma espécie resistente a sal, era mais sensível aos efeitos do sal, in vitro, do que a mesma enzima extraída de Zea mays, uma das espécies mais sensíveis à salinidade.

Existem poucos registros na literatura sobre o metabolismo dos ácidos nucleicos em condições salinas. Rauser & Hanson (1966) mostraram que em extremidades de raízes de soja, a salinidade causava uma inibição na síntese de DNA e de

proteína, além de retardar a síntese de RNA. / Variações no metabolismo dos ácidos nucleicos provocadas pela salinidade foram encontradas em ervilha, repolho e beterraba (Kabarrov & Aziyashvili, 1967). Recentemente, Vieira (1975) demonstrou que em cotilédones de sementes de Vigna sinensis, germinadas em condições salinas, havia uma menor degradação do DNA e do RNA quando comparada com aquela observada em cotilédones de sementes germinadas em condições normais. Além disso, foi demonstrado que a salinidade diminuía a atividade ribonucleásica.

Objetivos do presente trabalho

De acordo com o que foi exposto, podemos inferir que uma possibilidade para a inibição da germinação pela salinidade seria através de seus efeitos na mobilização das reservas da semente. Portanto, nada mais lógico do que se estudar os efeitos da salinidade nas atividades das enzimas envolvidas na mobilização dessas reservas. Utilizando cotilédones do feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi), estudamos os efeitos do NaCl in vivo e in vitro sobre algumas das enzimas envolvidas na mobilização e utilização do nitrogênio: RNase, por ser a enzima responsável pela mobilização do RNA (Vieira, 1975); protease 6,0 (caseinase) e LPase (peptidase), por serem enzimas envolvidas na mobilização das reservas proteicas (Beevers & Splittstoesser, 1968; Chrispeels & Boulter, 1975; Prisco et al., 1975; Uchoa, 1976).

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes e condições de germinação

No presente estudo foram utilizadas sementes do feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi), safra de 1974, proveniente da Fazenda Experimental do Vale do Curú, Pente-coste, Ceará, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará. Após uma rápida limpeza, as sementes foram acondicionadas em frascos de vidro, contendo sílica gel, e armazenadas a uma temperatura de aproximadamente 10°C.

As sementes foram selecionadas para germinação de acordo com a cor, o tamanho e a conformação, sendo excluídas sementes pequenas, escuras e mal conformadas. Depois de selecionadas, tratou-se as sementes por 10 minutos com uma solução de hipoclorito de sódio, contendo 5,2% de cloro ativo (Brilux, Raymundo da Ponte Indústria S/A, Olinda, Pernambuco), sendo excluídas as que flutuaram na referida solução, bem como aquelas que se apresentaram "queimadas" após esse tratamento. Em seguida, as sementes foram lavadas com bastante água destilada e semeadas entre 2 folhas de papel de filtro de 30 cm x 30 cm (papel Mata Borrão Filtro, 80 g/m², Companhia Fabricadora de Papel, São Paulo, SP), devidamente esterilizadas por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos e umedecidas com água destilada ou com uma solução de NaCl 0,1 M. Uma única fileira de 10 sementes foi semeada a aproximadamente 2,5 cm da borda superior do papel. Após a semeadura, cinco conjuntos de folhas de papel de filtro, contendo 10 sementes cada, foram enroladas e dispostas verticalmente dentro de depósitos de plástico. Em cada um desses depósitos adicionou-se 20 ml da mesma solução usada para umedecer o papel. Os depósitos plásticos, contendo as sementes, foram en-

tão colocados dentro de cubas de vidro e estas mantidas na obscuridade. A temperatura e a umidade relativa registradas no interior das cubas, durante o período experimental, foram $25 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ e 100%, respectivamente.

Medidas do crescimento

As medidas do crescimento foram baseadas nas determinações do peso fresco e do peso seco de cotilédones e eixos embrionários. Para tais determinações colheu-se plântulas nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, após a semeadura em água destilada ou em NaCl 0,1 M. Foram feitas 3 repetições, cada uma envolvendo a pesagem de 10 cotilédones ou 20 eixos embrionários. Depois das determinações de peso fresco, colocou-se os cotilédones ou eixos embrionários em frascos de vidro, deixando-os na estufa a 100°C por 24 horas, quando então foram determinados seus pesos secos.

Atividade enzimática

Foram estudadas as atividades de três enzimas hidrolíticas obtidas de extratos de cotilédones. Determinou-se a atividade proteolítica pela capacidade de promover a hidrólise da caseína e a enzima responsável por esta atividade foi denominada de protease 6,0; a atividade peptidásica foi determinada pela capacidade de promover a hidrólise da L-leucina-p-nitroanilida (LPA) e a enzima responsável por esta atividade foi denominada de LPase; finalmente, determinou-se a atividade ribonucleásica pela capacidade de promover a hidrólise do ácido ribonucleico (RNA) e a enzima responsável por esta atividade foi denominada de RNase. A preparação dos extratos usados nas determinações das atividades enzimáticas

foi feita à temperatura de 8-10°C.

Foi estudado o efeito do NaCl na atividade enzimática in vivo e in vitro. Nos experimentos in vivo determinou-se a atividade enzimática ao longo da germinação, em extratos de cotilédones provenientes de sementes semeadas em água destilada ou em NaCl 0,1 M. Nos experimentos in vitro, a atividade enzimática foi estudada em extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes ou semeadas em água destilada, e foi determinada em função das quantidades crescentes de NaCl no meio de ensaio.

Para a determinação da concentração de proteína, utilizou-se o método do microbiureto descrito por Goa(1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina, cristalizada e liofilizada (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO., U.S.A).

Atividade proteolítica

A extração de enzimas proteolíticas foi feita pela homogeneização de 10 cotilédones com tampão fosfato pH 7,6, I = 0,05 na proporção de 1:10 (p:v). Centrifugou-se o homogenato a 8.000 x g por 20 minutos, sendo o precipitado desprezado. A reação enzimática foi feita segundo Ainouz et al. (1972) e se processou pela adição de 1,0 ml do extrato, convenientemente diluído, a 5,0 ml de caseína(segundo Harmmmarsten, E. Merck, Darmstadt) a 1% em tampão fosfato pH 6,0, I=0,05, sem NaCl quando do estudo in vivo e com concentrações crescentes de NaCl nos experimentos in vitro. A temperatura de incubação foi 50°C e o tempo de reação foi de 60 minutos. A reação foi cessada pela adição de 1,0 ml de ácido tricloro acético (TCA) a 40%. Em seguida, deixou-se a mistura em repouso por 30 minutos, a qual foi filtrada em papel de filtro Whatman 42. A prova em branco do ensaio foi obtida pela adição do substrato ao extrato após ter sido adicionado TCA 40%. Determinou-se a atividade proteolítica em 1,0 ml do filtrado do

ensaio, após a reação com o reagente de Folin (Lowry et al., 1951) e medição da absorbância em 750 nm (A_{750}) num espectrofotômetro Beckmann DU. Dos valores de absorbância das amostras subtraiu-se os valores das provas em branco. Essas diferenças de absorbância foram multiplicadas pelos fatores de diluição e pelos volumes dos extratos, sendo este produto dividido pelo número de cotilédones utilizados na preparação do extrato. Portanto, a atividade proteolítica total foi expressa em ΔA_{750} por cotilédone. A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade total por cotilédone pela concentração de proteína por cotilédone.

Nos experimentos in vitro e naqueles referentes ao estabelecimento das condições ótimas de ensaio para a protease 6,0, utilizou-se extratos de sementes quiescentes.

Atividade peptidásica

O extrato contendo a enzima LPase foi preparado de maneira semelhante àquela descrita para a atividade proteolítica, sendo que, neste caso, utilizou-se como meio de extração o tampão fosfato pH 7,6, I = 0,05 com NaCl 0,1 M. A reação enzimática foi feita segundo Erlanger et al. (1961) e se processou pela adição de 1,0 ml do extrato, convenientemente diluído, a 4,0 ml do substrato sintético L-leucina-p-nitroanilida (LPA) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO., U.S.A.) na concentração de 4×10^{-4} M, em tampão fosfato pH 7,0, I=0,05 com NaCl 0,4 M. Nos experimentos in vitro as concentrações de NaCl no tampão do ensaio foram crescentes. A temperatura de incubação foi de 40°C e o tempo de reação foi de 10 minutos. A reação foi parada pela adição de 1,0 ml de ácido acético glacial a 30%. Após 10 minutos de repouso as medidas de atividade peptidásica foram feitas pelas leituras de absorbância em 410 nm (A_{410}) em espectrofotômetro Beckmann DU. Obteve-se a prova em branco da reação pela adição de substrato

ao extrato, após ter sido adicionado ácido acético glacial a 30%. Dos valores de absorvância das amostras subtraiu-se os valores referentes às provas em branco. Essas diferenças em absorvância foram multiplicadas pelos fatores de diluição e pelos volumes dos extratos, sendo este produto dividido pelo número de cotilédones utilizados na preparação do extrato. A atividade peptidásica total foi expressa em unidades de atividade (UA) por cotilédone, sendo uma UA correspondente a uma ΔA_{410} de 0,500. A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade total por cotilédone pela concentração de proteína por cotilédone.

Nos experimentos in vitro e naqueles referentes ao estabelecimento das condições ótimas de ensaio para a LPase, foram utilizados extratos de sementes quiescentes.

Atividade ribonucleásica

O extrato contendo a enzima RNase foi preparado de maneira semelhante àquela descrita por Vieira (1975). Homogeneizou-se 15 cotilédones, com tampão fosfato 0,1 M, pH 5,7, numa proporção de 1:10 (p:v). Centrifugou-se o homogenato a 3.000 x g por 10 minutos, tendo-se desprezado o precipitado. O sobrenadante foi ajustado a pH 5,1 por adição de HCl 0,5 N, seguindo-se um repouso em refrigerador por aproximadamente 16 horas e posterior centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos. A reação enzimática foi feita segundo Tuve & Anfinsen (1960) e se processou pela adição de 0,2 ml do extrato a 1,7 ml de tampão citrato 0,05 M, pH 5,2 e 0,6 ml de RNA(NBCo, purificado de acordo com Vieira, 1975) a 0,5%. A temperatura de incubação foi de 40°C e o tempo de reação foi de 20 minutos. A reação foi parada com 0,5 ml de acetato de uranila 0,75% em HClO₄ a 25%. A mistura final, após um repouso de 10 minutos, foi filtrada em papel de filtro Whatman 42. A prova em branco da reação obteve-se pela adição de substrato ao extra

to, após ter sido adicionado o acetato de uranila 0,75% em HClO_4 a 25% ao extrato. Determinou-se a atividade ribonucleásica pelas leituras de absorbância em 260 nm (A_{260}), num espectrofotômetro Beckmann DU, em amostras contendo 0,2 ml do filtrado do ensaio com 4,8 ml de água destilada. Dos valores de absorbância das amostras foram subtraídos os valores das provas em branco. Multiplicou-se essas diferenças de absorbância pelos fatores de diluição e pelos volumes dos extratos, sendo este produto dividido pelo número de cotilédones utilizados na preparação do extrato. A atividade ribonucleásica total foi expressa em unidades de atividade (UA) por cotilédone, sendo uma UA correspondente a uma ΔA_{260} de 0,01. Determinou-se a atividade específica dividindo-se a atividade total por cotilédone pela concentração de proteína por cotilédone.

Nos experimentos in vitro e naqueles referentes ao estabelecimento das condições ótimas de ensaio, para a RNase, foram utilizados extratos de cotilédones provenientes de plântulas com 5 dias de germinação em água destilada.

Delineamento experimental e análise estatística

A análise estatística dos resultados dos experimentos in vivo foi feita partindo-se de um delineamento hierárquico com dois fatores. O primeiro fator possuía dois níveis (controle e sal) e o segundo correspondia aos dias após a semeadura das sementes, que variaram conforme o experimento. Estudou-se as variáveis: peso seco dos cotilédones e eixos embrionários, peso fresco dos cotilédones e eixos embrionários, atividade proteolítica total e específica, atividade peptidásica total e específica e atividade ribonucleásica total e específica. Usando-se o delineamento acima, determinou-se as diferenças estatísticas entre o controle e o sal pelo

teste F, a partir da análise de variância (Snedecor, 1956).

Os resultados dos experimentos in vitro foram analisados com base em um delineamento inteiramente ao acaso, onde os tratamentos referiam-se às concentrações de sal. As variáveis estudadas foram: atividade proteolítica total e específica, atividade peptidásica total e específica e atividade ribonucleásica total e específica. Com o objetivo de se comparar o valor de cada variável quando em ausência de sal com os outros valores nos diversos tratamentos, foi usado o teste de Williams (1971).

O sumário das análises estatísticas se encontra nas Tabelas IX, X e XI do anexo.

RESULTADOS

Crescimento das plântulas

O crescimento das plântulas foi expresso em função dos pesos fresco e seco dos cotilédones e eixos embrionários (Tabelas I e II, Figuras 1 e 2).

O peso fresco dos cotilédones retirados de plântulas provenientes de sementes semeadas em água destilada (controle) aumentou durante os 3 primeiros dias após a semeadura, quando começou a decrescer, chegando, no 7º dia, a atingir o valor de 59,5% daquele apresentado no dia zero (Tabela I, Figura 1). Nos cotilédones oriundos de plântulas provenientes de sementes semeadas em solução de NaCl, este valor aumentou durante os 3 primeiros dias, permaneceu constante até o 5º e decresceu ligeiramente no 7º dia. No último dia após a semeadura, o peso fresco dos cotilédones do tratamento controle foi 2,5 vezes menor do que o dos cotilédones retirados de plântulas originadas de sementes semeadas em solução de NaCl.

Os pesos secos dos cotilédones retirados de plântulas provenientes dos dois tratamentos decresceram desde o dia zero até o 7º dia após a semeadura (Tabela II, Figura 2). Nos cotilédones oriundos de plântulas do tratamento controle, o peso seco, no último dia do experimento, atingiu um valor que representa 15% do apresentado no dia zero. Nesta ocasião, os valores de peso seco dos cotilédones retirados de plântulas provenientes de sementes semeadas em NaCl foram 3,9 vezes maiores do que os apresentados por cotilédones oriundos de plântulas do tratamento controle.

Os pesos fresco e seco dos eixos embrionários das

TABELA I. Peso fresco de cotilédones e eixos embrionários durante a germinação de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (C) e em solução de NaCl 0,1 M (S).

Dias após a semeadura	Peso fresco (mg x parte da plântula ⁻¹)			
	Cotilédone ⁽¹⁾		Eixo embrionário ⁽¹⁾	
	C	S	C	S
0	<u>98,4</u>	<u>98,4</u>	<u>3,5</u>	<u>3,5</u>
1	159,7	141,7	<u>7,9</u>	<u>6,1</u>
3	<u>168,0</u>	<u>157,7</u>	178,7	44,8
5	102,3	157,4	828,7	189,7
7	58,6	148,2	1.472,0	329,0

(1) - Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

TABELA II. Peso seco de cotilédones e eixos embrionários durante a germinação de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (C) e em solução de NaCl 0,1 M (S).

Dias após a semeadura	Peso seco (mg x parte da plântula ⁻¹)			
	Cotilédone ⁽¹⁾		Eixo embrionário ⁽¹⁾	
	C	S	C	S
0	<u>88,4</u>	<u>88,4</u>	<u>3,1</u>	<u>3,1</u>
1	<u>81,6</u>	<u>79,4</u>	<u>3,4</u>	<u>3,1</u>
3	<u>71,3</u>	<u>73,8</u>	16,1	7,7
5	32,3	65,3	55,7	19,6
7	14,0	53,9	83,2	32,1

(1) - Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

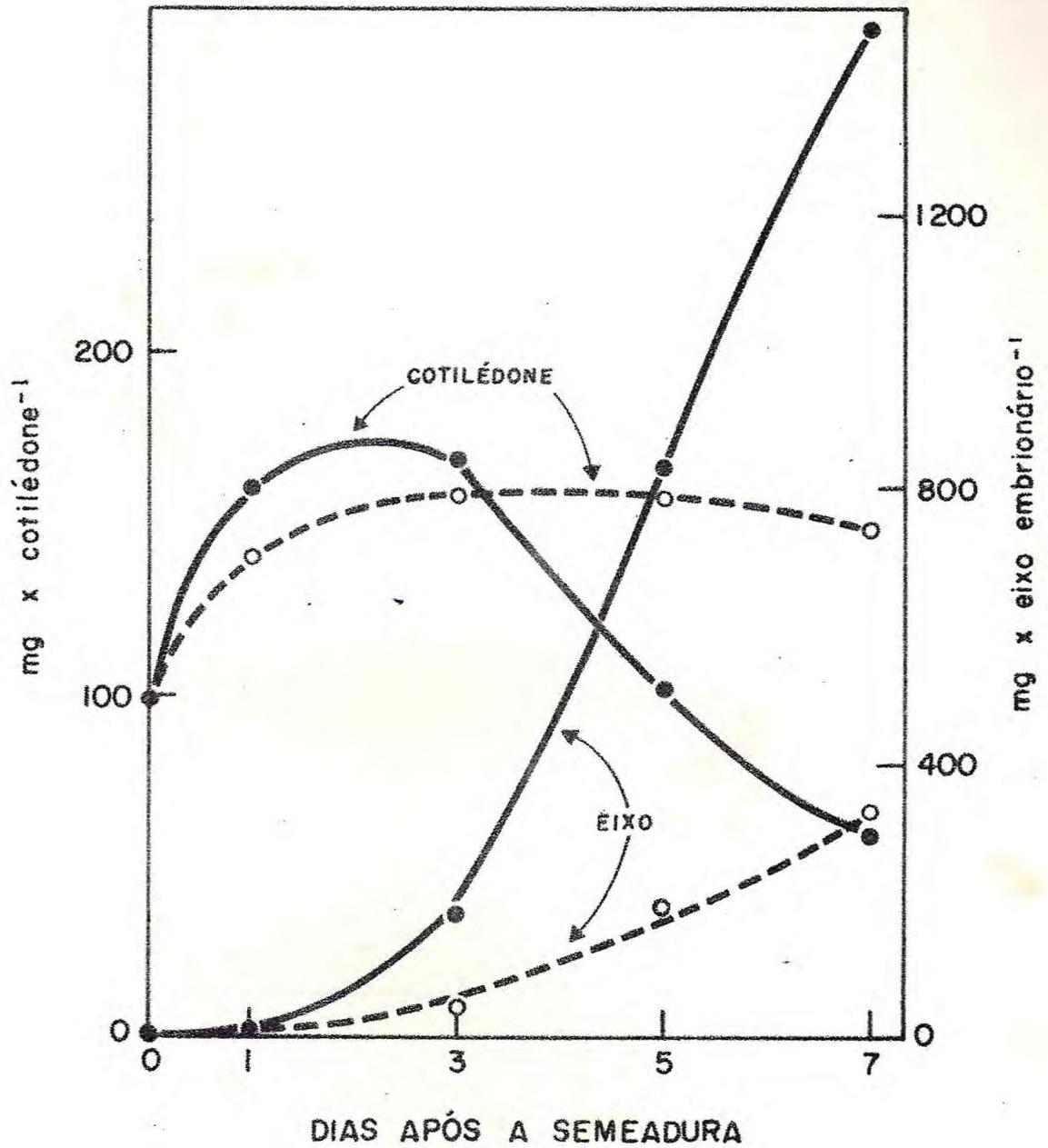


Figura 1 - Peso fresco de cotilédones e eixos embrionários durante a germinação de sementes de feijão de corda-pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1M (○---○).

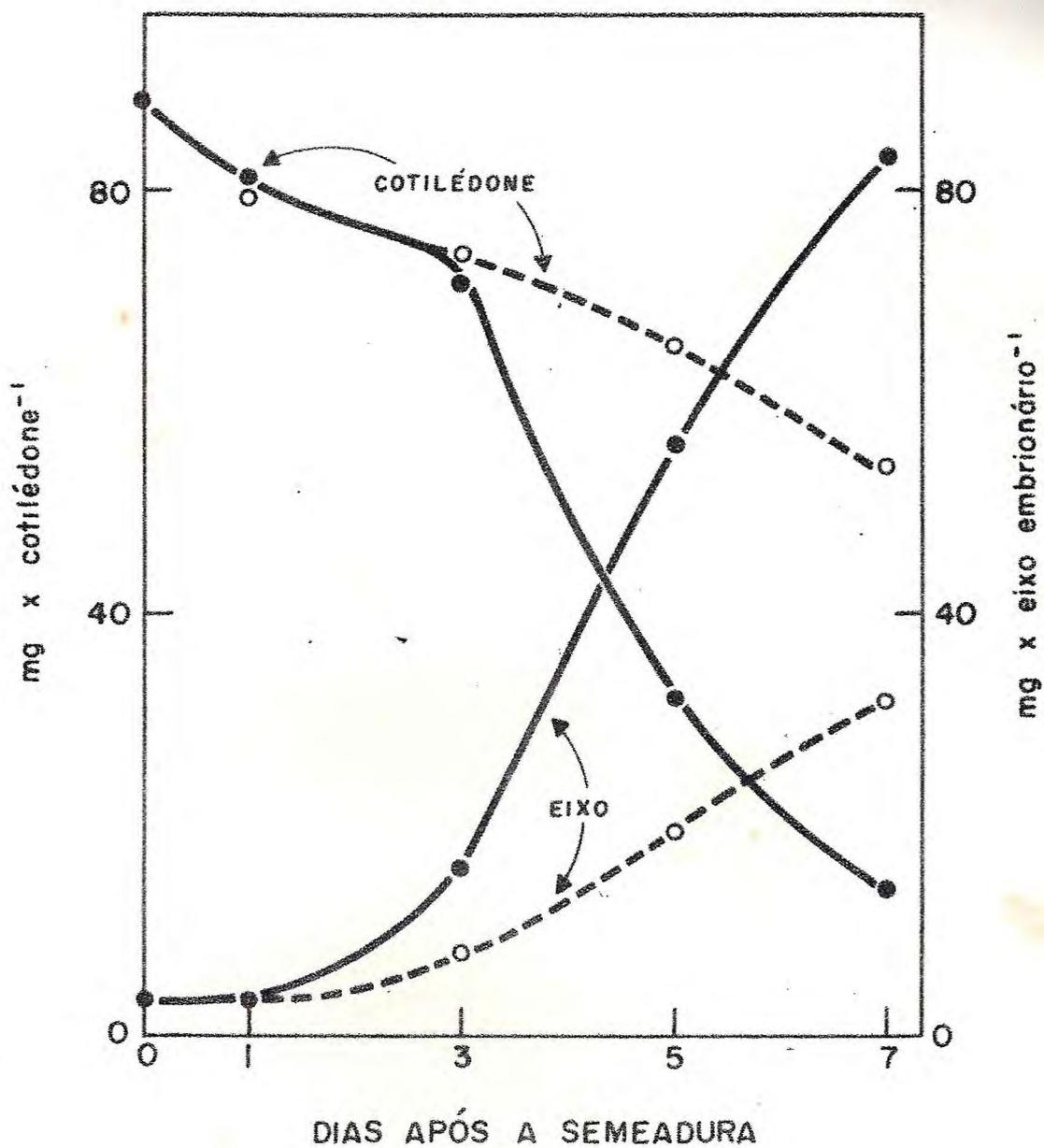


Figura 2 - Peso seco de cotilédones e eixos embrionários durante a germinação de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1 M (○----○).

plântulas provenientes dos dois tratamentos permaneceram constantes até o 1º dia após a sementeira e cresceram deste até o 7º dia (Tabelas I e II, Figuras 1 e 2). Todavia, desde o início até o final do experimento, os valores obtidos para os eixos embrionários das plântulas do tratamento controle foram sempre maiores do que os apresentados pelos eixos retirados das plântulas do tratamento salino. No último dia do experimento, os valores de peso fresco (Tabela I, Figura 1) e de peso seco (Tabela II, Figura 2) dos eixos embrionários retirados de plântulas provenientes do tratamento controle foram, respectivamente, 4,5 e 2,6 vezes maiores do que os obtidos para eixos oriundos de plântulas provenientes de sementes semeadas em NaCl.

Atividade proteolítica

O estudo da atividade proteolítica durante a germinação foi precedido da determinação das condições ótimas de ensaio para a protease 6,0, em extratos obtidos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes. Na faixa de pH estudada (6,0 a 7,6), a atividade proteolítica diminuiu à medida que o pH aumentou, sendo escolhido como pH do ensaio o valor em que a atividade foi mais alta (Figura 3 (A)). Para que a reação enzimática se processasse em excesso de substrato, determinou-se a relação enzima-substrato. Da curva obtida ficou estabelecida a relação de 0,5 mg de caseína para 1,0 ml do extrato, diluído 1:10 (v:v) com o tampão de extração, sendo o volume final da reação 6,0 ml (Figura 3 (B)). A atividade enzimática aumentou em função das crescentes quantidades de extrato (enzima bruta) na mistura de reação, porém só houve linearidade até um valor de $\Delta A_{750} \times h^{-1}$ de aproximadamente 0,300 (Figura 3 (C)). Em vista disso, todas as medidas de atividade proteolítica foram feitas a partir de leituras de

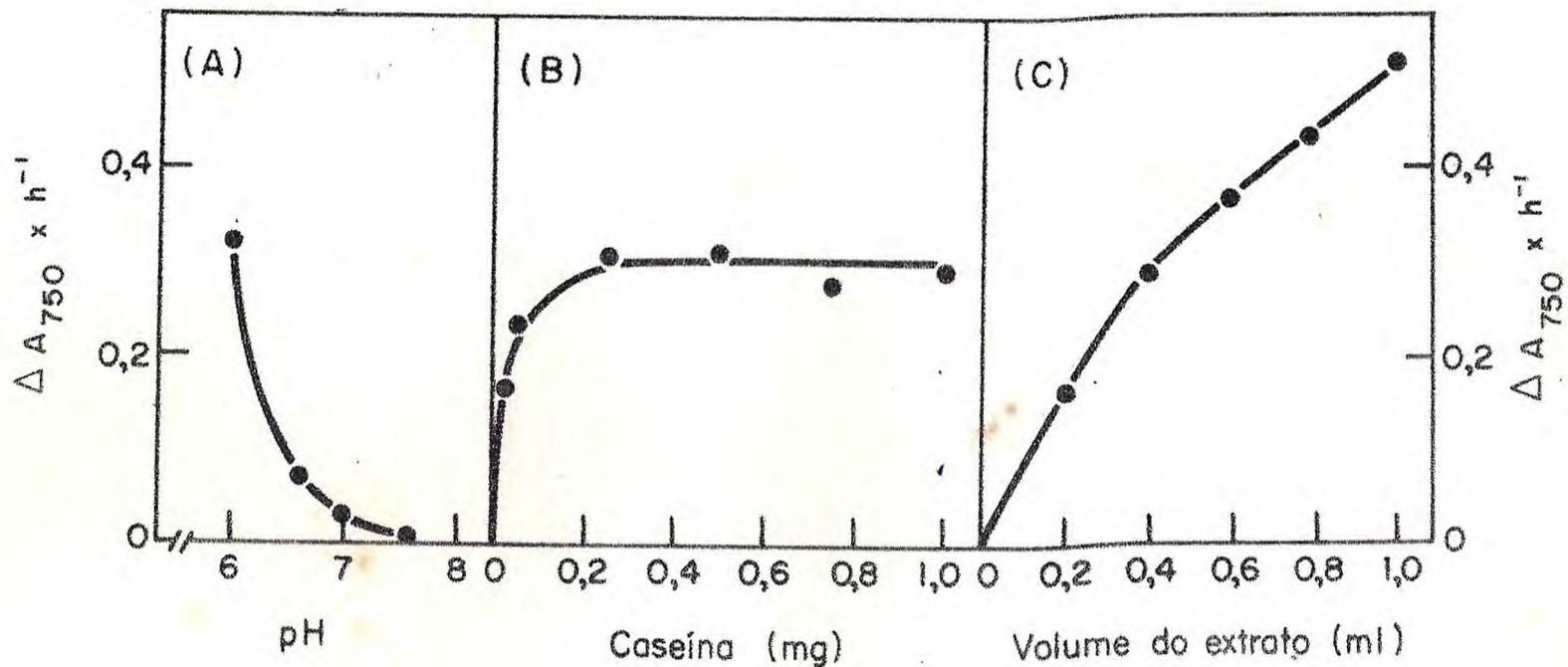


Figura 3 - Características da protease 6,0 extraída de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L)Savi). (A): Curva de pH para o ensaio de atividade proteolítica, usando-se caseína como substrato. (B): Curva de atividade proteolítica em função de quantidades crescentes de substrato (caseína), sendo o pH da mistura de reação 6,0. (C): Curva de atividade proteolítica em função de quantidades crescentes de extrato (enzima bruta). O extrato original em (A) e em (B) foi diluído com o tampão de extração na proporção de 1:10 (v:v) e em (C) esta diluição foi de 1:5 (v:v).

absorbância que resultassem em valores de $\Delta A_{750} \times h^{-1}$ menores ou iguais a 0,300.

Experimentos in vivo

Nos experimentos in vivo, encontrou-se que a atividade proteolítica total (Tabela III, Figura 4) nos cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda que haviam sido semeadas em água (controle) cresceu ligeiramente até o 3º dia após a semeadura, quando começou a decrescer, atingindo, no final do experimento, um valor de 79,0% daquele apresentado no dia zero. Para as sementes que haviam sido semeadas em solução de NaCl (tratamento salino), a atividade proteolítica total nos cotilédones, durante os 3 primeiros dias após a semeadura, não diferiu daquela encontrada nos cotilédones retirados de plântulas provenientes do tratamento controle. No 7º dia após a semeadura seu valor foi o mesmo encontrado para o dia zero (Tabela III, Figura 4). A atividade específica (Tabela III, Figura 5), nos cotilédones provenientes do tratamento controle, cresceu do início até o final do experimento, quando atingiu um valor 2,9 vezes maior do que o apresentado no dia zero. Nos cotilédones oriundos do tratamento salino a atividade específica também cresceu do início até o final do experimento, porém, o seu valor, no último dia de germinação, foi apenas 1,71 vezes maior do que aquele encontrado para o dia zero. Do 3º ao último dia do período estudado, a atividade específica nos cotilédones retirados de plântulas provenientes do tratamento controle foi sempre superior àquela obtida em cotilédones oriundos de plântulas provenientes de sementes que haviam sido semeadas em solução de NaCl (Tabela III, Figura 5).

Dos extratos utilizados para os ensaios de atividade proteolítica foram retiradas amostras e feitas determinações de proteína (Figura 6). A concentração de proteína nos

TABELA III. Atividade proteolítica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitíuba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (C) e em solução de NaCl 0,1 M (S).

Dias após a semeadura	Atividade total ⁽¹⁾		Atividade específica ⁽¹⁾	
	$(\Delta A_{750} \times \cot^{-1} \times h^{-1})$		$(\Delta A_{750} \times h^{-1} \times \text{mg prot}^{-1})$	
	C	S	C	S
0	<u>3,09</u>	<u>3,09</u>	<u>0,150</u>	<u>0,150</u>
1	<u>3,58</u>	<u>3,59</u>	<u>0,162</u>	<u>0,172</u>
3	<u>3,61</u>	<u>3,57</u>	0,240	0,196
5	<u>3,11</u>	<u>3,03</u>	0,391	0,185
7	2,44	3,16	0,434	0,256

(1) - Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

Os valores acima são médias de 3 repetições, tendo sido efetuadas 3 leituras de ΔA_{750} para cada repetição.

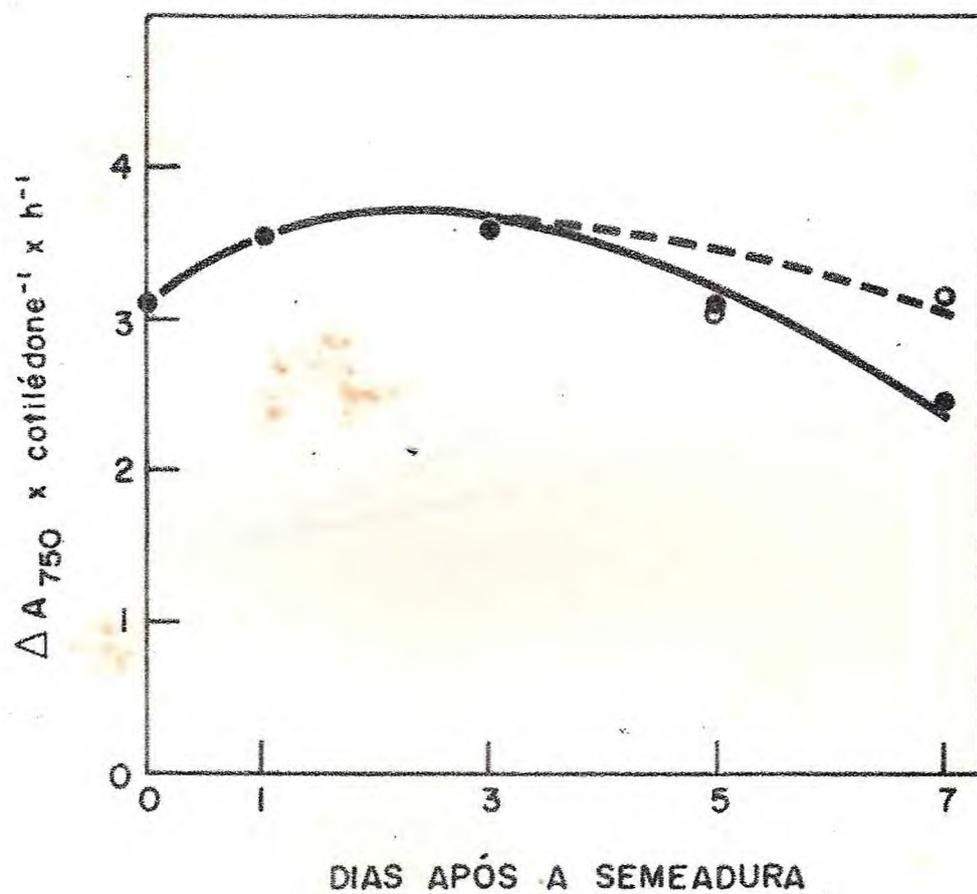


Figura 4 - Atividade proteolítica total de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1 M (○----○).

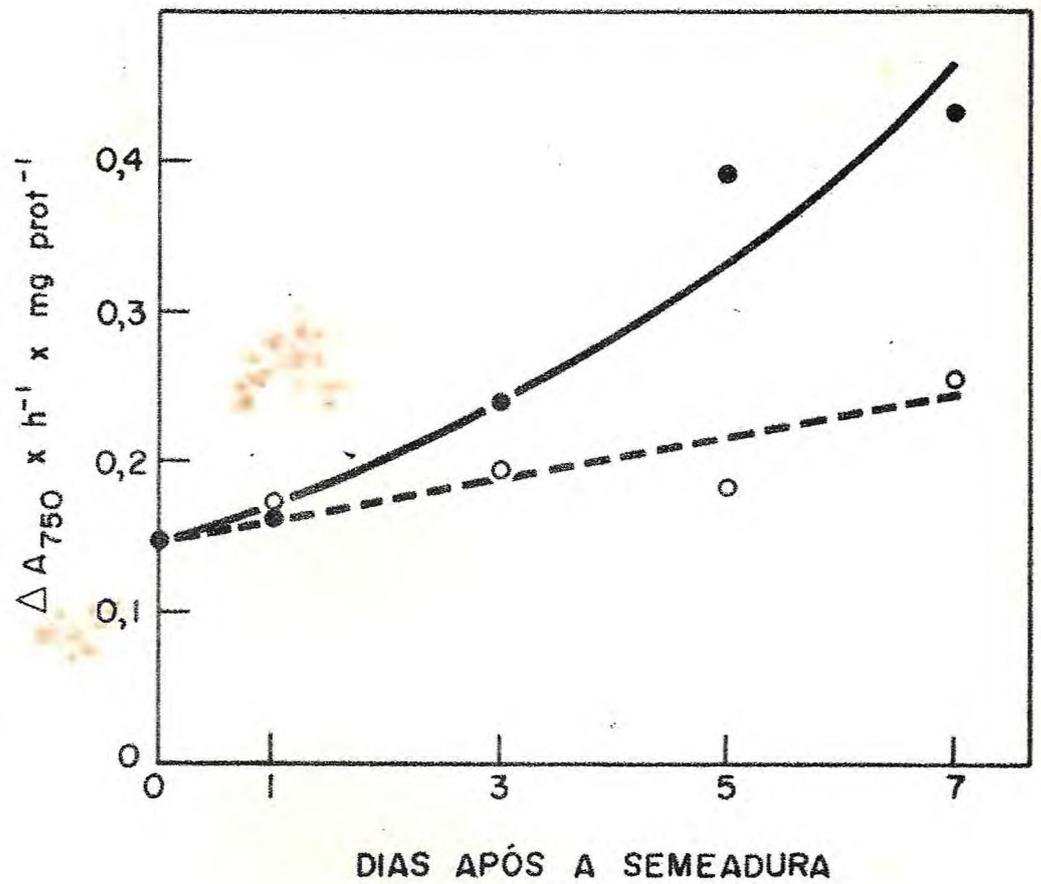


Figura 5 - Atividade proteolítica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1 M (o----o).

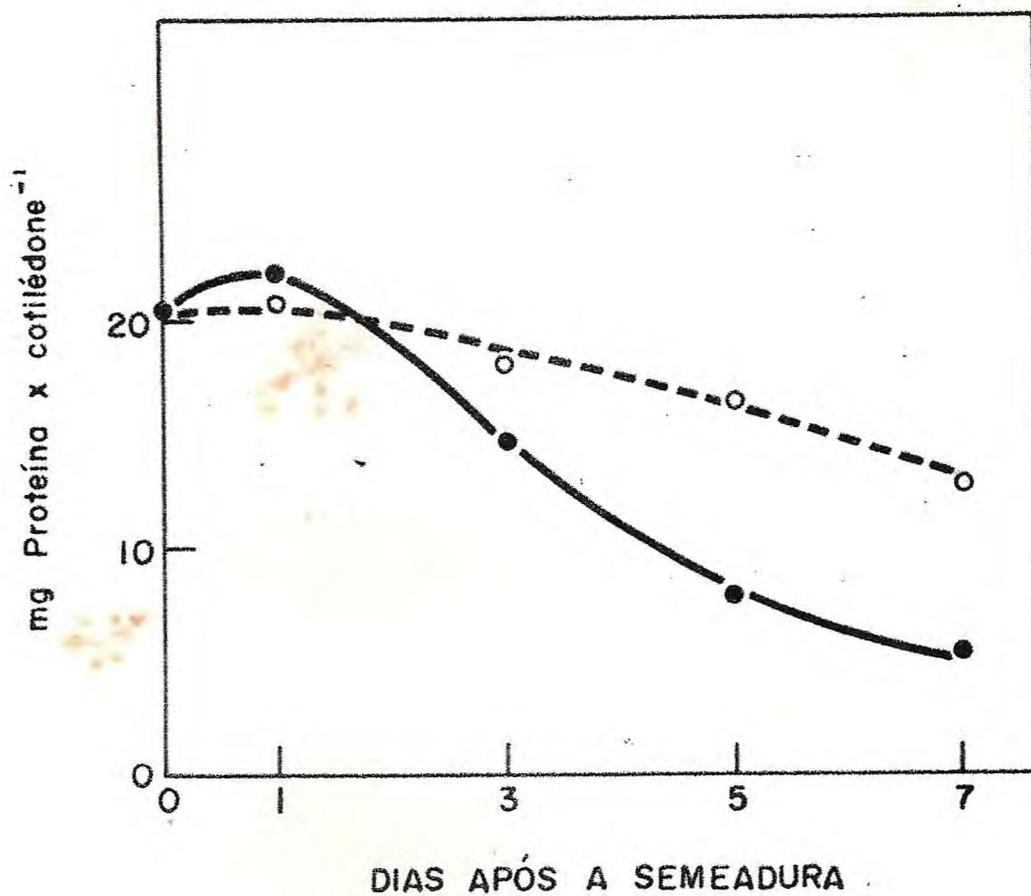


Figura 6 - Concentração de proteína em extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda-pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1 M (○----○).

extratos de cotilédones oriundos de plântulas provenientes do tratamento controle aumentou no 1º dia após a sementeira, começando então a decrescer, chegando, no 7º dia, a atingir o valor de 27,4% daquele apresentado no dia zero. Nos extratos de cotilédones provenientes do tratamento salino este valor permaneceu constante até o 1º dia após a sementeira, quando começou a decrescer, chegando, no final do experimento, a atingir o valor de 63,2% daquele apresentado no dia zero (Figura 6). Além disso, do 3º ao 7º dia após a sementeira, os valores de concentração de proteína nos extratos de cotilédones provenientes do tratamento salino foram sempre maiores do que os encontrados para os provenientes do tratamento controle.

Experimentos in vitro

Nos experimentos in vitro a atividade proteolítica total e específica foi determinada em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação (Tabela IV, Figura 7). Esta atividade diminuiu à medida que a concentração de NaCl na mistura de reação aumentou, (Figura 7). Tal diminuição de atividade foi estatisticamente significativa quando a concentração de NaCl na mistura de reação era igual ou maior do que 0,1 M.

Como tais resultados poderiam ser devidos a efeitos do NaCl sobre os produtos de hidrólise, resultantes da ação da protease 6,0 e não sobre a reação enzimática propriamente dita, foi feito um experimento para esclarecer este fato. Isto foi testado pela adição de concentrações crescentes de NaCl ao filtrado do ensaio, antes de se processar a reação com o reagente de Folin. Os valores de A_{750} apresentados na Figura 8 demonstram que este sal não tem efeito sobre os produtos de hidrólise, resultantes da ação da protease 6,0.

Poderia também ser interpretado que a inibição apresentada na Tabela IV e Figura 7 era devida a impurezas (me-

TABELA IV. Atividade proteolítica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pituiúba (Vigna sinensis (L) Savi) em função de quantidades crescentes de NaCl na mistura de reação.

Concentração de NaCl na mistura de reação (M)	Atividade total (% do controle)	Atividade específica (% do controle)
0,00	100,0	100,0
0,02	94,0	94,0
0,10	62,5*	66,7*
0,18	52,4*	52,1*
0,68	30,2*	30,8*
1,35	18,1*	17,9*

(*) - Valores estatisticamente diferentes (ao nível de 5%) quando comparados com o controle (NaCl 0,00 M) dentro de uma mesma coluna.

Os valores acima são médias de 3 repetições, tendo sido efetuadas 3 leituras de ΔA_{750} para cada repetição.

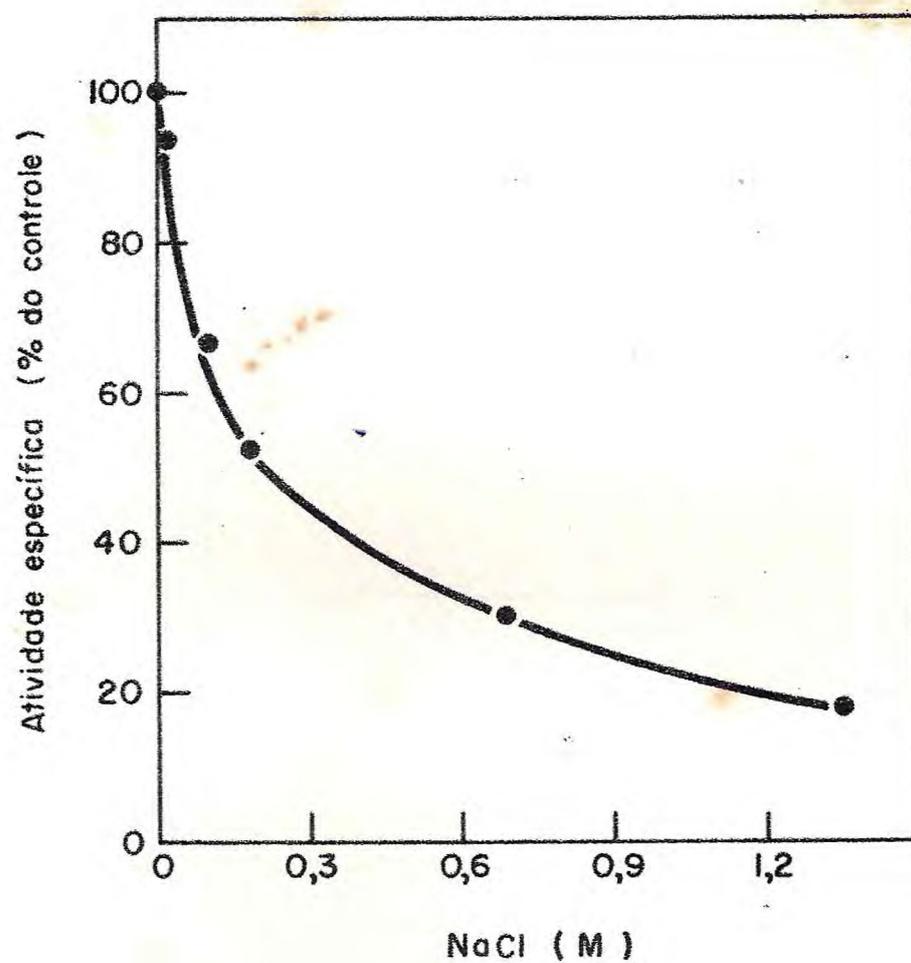


Figura 7 - Atividade proteolítica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação.

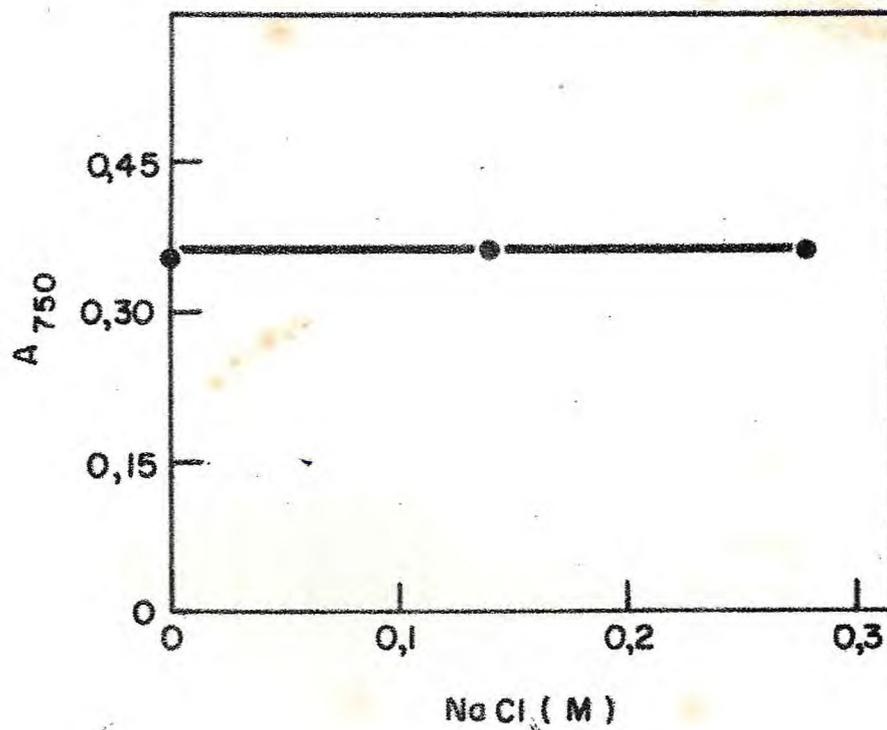


Figura 8 - Efeito do NaCl sobre os produtos de hidrólise da protease 6,0 extraída de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pituíba (Vigna sinensis (L) Savi).

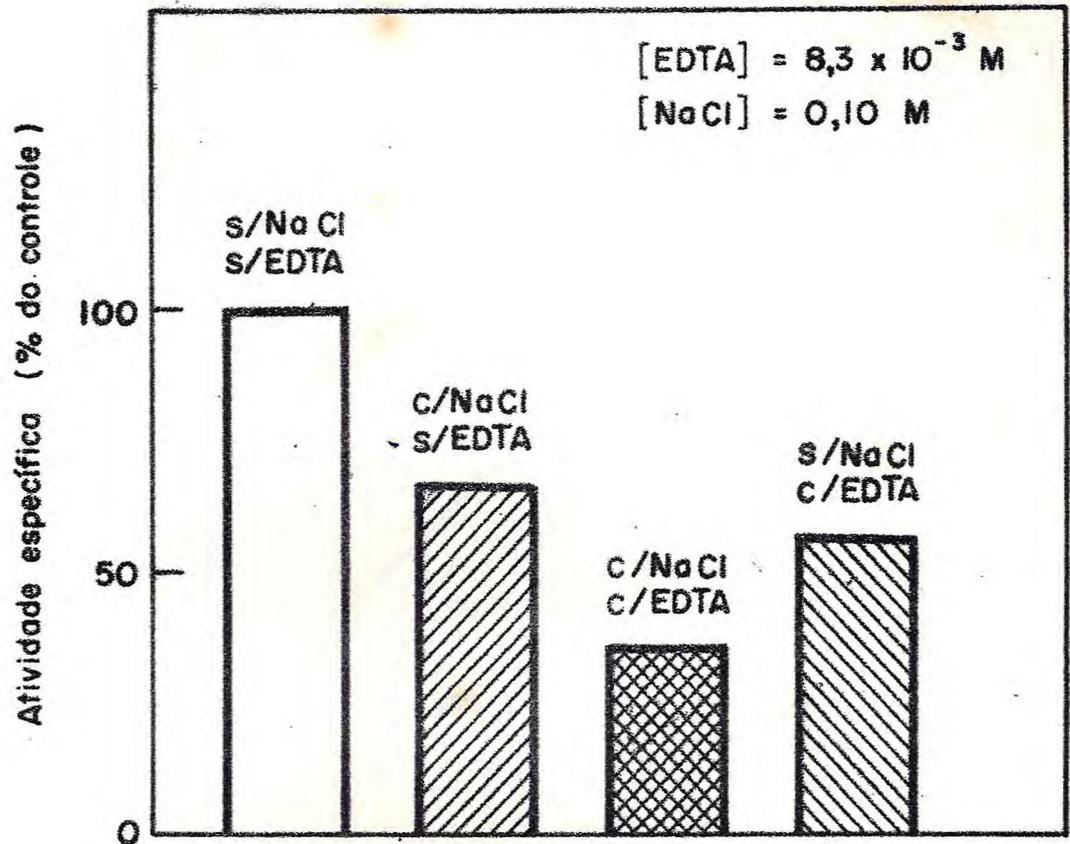


Figura 9 - Efeito da presença de EDTA na mistura de reação sobre a atividade proteolítica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi).

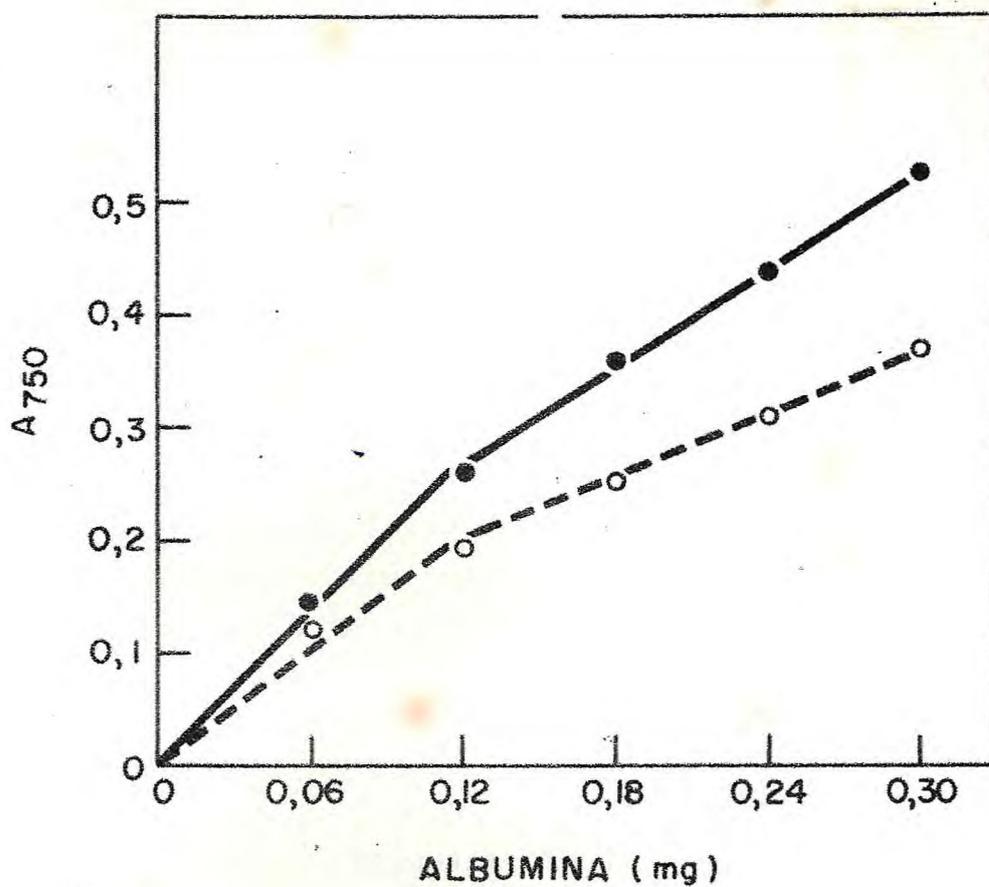


Figura 10 - Leituras em 750 nm dos produtos da reação com o reagente de Folin em ausência (●—●) e presença de EDTA $8,3 \times 10^{-3} M$ (o----o).

tais pesados) existentes na mistura de reação e não ao NaCl propriamente dito. Isto também foi testado, usando-se EDTA como agente quelante. A Figura 9 demonstra que a inibição foi realmente devida ao NaCl. Além disso, o EDTA causa também uma inibição aparente na atividade específica (Figura 9), que em grande parte é devida a seus efeitos sobre a reação de Folin (Figura 10).

Atividade peptidásica

O estudo da atividade peptidásica durante a germinação foi precedido da determinação das condições ótimas de ensaio para a LPase, em extratos obtidos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes. A atividade peptidásica apresentou-se máxima na faixa de pH entre 6,6 e 7,0, sendo escolhido este último valor como o pH a ser utilizado para essa reação (Figura 11 (A)). Para que a reação enzimática se processasse em excesso de substrato, determinou-se a relação enzima-substrato. Da curva obtida ficou estabelecida a relação de 0,4 mg de substrato (LPA) para 1,0 ml do extrato, diluído 1:15 (v:v) com o tampão de extração, sendo o volume final da reação 5,0 ml (Figura 11 (B)). A atividade enzimática aumentou linearmente em função das crescentes quantidades de extrato (enzima bruta) na mistura de reação (Figura 11(C)).

Experimentos in vivo

Nos experimentos in vivo, encontrou-se que a atividade peptidásica total (Tabela V, Figura 12) nos cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda semeadas em água (controle) cresceu até o 1º dia após a semeadura e decresceu deste dia até o final do período estudado, quando atingiu um valor de 23,1% daquele apresentado no dia zero. Para as semente

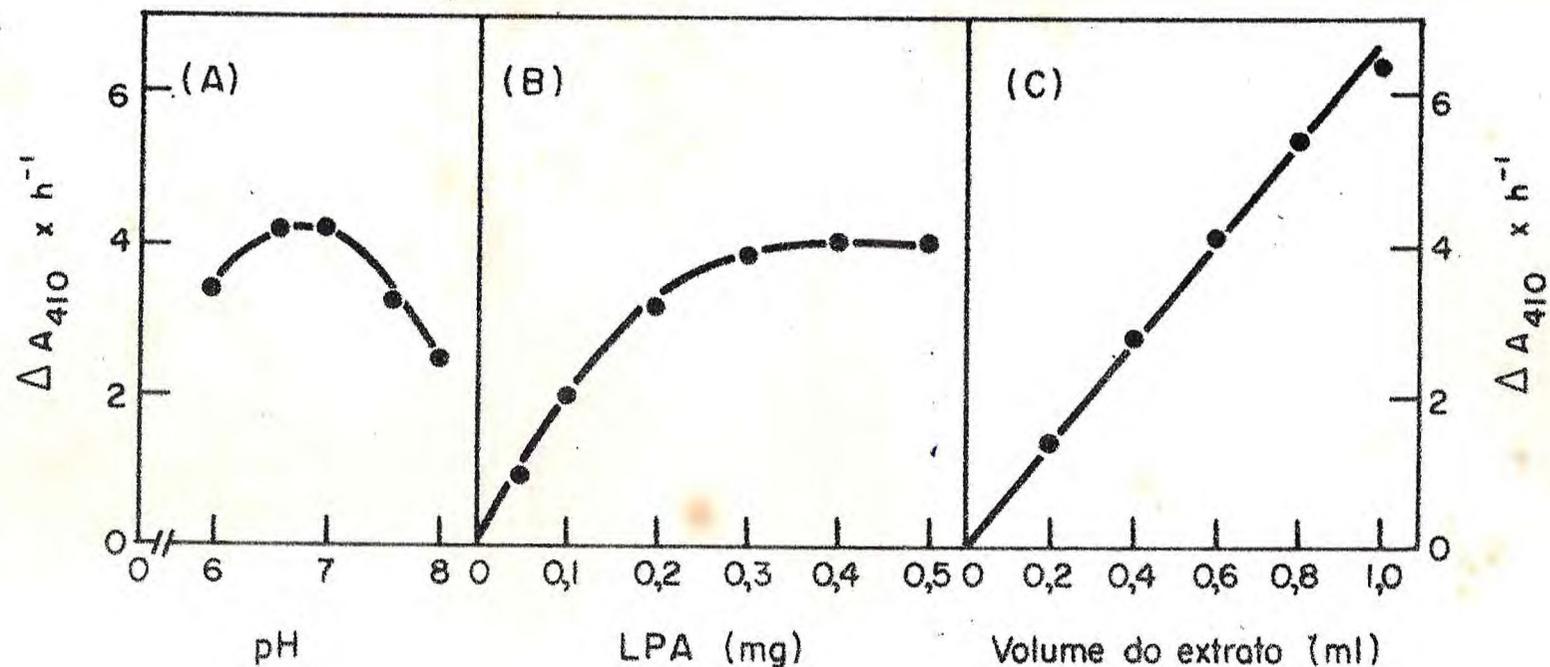


Figura 11 - Características da LPase extraída de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi). (A): Curva de pH para o ensaio de atividade peptidásica, usando-se LPA como substrato. (B): Curva de atividade peptidásica em função de quantidades crescentes de substrato (LPA), sendo o pH da mistura de reação 7,0. (C): Curva de atividade peptidásica em função de quantidades crescentes de extrato (enzima bruta). O extrato original em (A) e em (B) foi diluído com o tampão de extração na proporção de 1:15 (v:v) e em (C) esta diluição foi de 1:10 (v:v).

tes que haviam sido semeadas em solução de NaCl (tratamento salino), a atividade peptidásica total nos cotilédones cresceu ligeiramente até o 3º dia após a sementeira, quando começou a decrescer, atingindo 83,6% do valor inicial ao final do experimento (Tabela V, Figura 12). Nos dois primeiros dias após a sementeira, a atividade total nos cotilédones derivados de sementes do tratamento salino foi menor ou igual à atividade apresentada por extratos provenientes de cotilédones derivados de sementes do tratamento controle. Todavia, do 3º dia em diante esta atividade foi sempre maior no tratamento salino do que no tratamento controle (Tabela V, Figura 12). As atividades específicas (Tabela V, Figura 13), nos cotilédones provenientes de plântulas de ambos os tratamentos, foram estatisticamente iguais e suavemente crescentes até o 3º dia após a sementeira. De este dia, até o final do período estudado, elas decresceram, sendo que a atividade específica nos cotilédones retirados de plântulas do tratamento controle foi sempre estatisticamente inferior àquela obtida em cotilédones provenientes de plântulas do tratamento salino (Tabela V, Figura 13). No 7º dia após a sementeira, a atividade específica, nos cotilédones provenientes de plântulas do tratamento salino, atingiu um valor ligeiramente inferior àquele apresentado no dia zero, enquanto que a atividade específica, nos cotilédones provenientes de plântulas do tratamento controle, atingiu um valor de 60,3% daquele apresentado no dia zero.

Dos extratos utilizados para os ensaios de atividade peptidásica foram retiradas amostras e feitas as determinações de proteína. Tanto a concentração de proteína nos extratos de cotilédones oriundos de plântulas provenientes do tratamento controle, como aquela obtida de plântulas do tratamento salino, tiveram comportamento semelhante àquele apresentado quando do estudo com a protease 6,0 (Figura 6).

TABELA V. Atividade peptidásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pituiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (C) e em solução de NaCl 0,1 M (S).

Dias após a semeadura	Atividade total ⁽¹⁾ (UA x cot ⁻¹ x h ⁻¹)		Atividade específica ⁽¹⁾ (UA x h ⁻¹ x mg prot ⁻¹)	
	C	S	C	S
	0	<u>97,08</u>	<u>97,08</u>	<u>5,27</u>
1	123,24	108,84	<u>5,32</u>	<u>5,84</u>
2	<u>109,32</u>	<u>106,44</u>	<u>5,53</u>	<u>5,53</u>
3	93,24	108,84	<u>5,82</u>	<u>6,11</u>
4	68,04	98,16	4,55	5,17
5	44,64	94,08	3,95	5,08
7	22,44	81,12	3,18	4,99

(1) - Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

Os valores acima são médias de 3 repetições, tendo sido efetuadas 3 leituras de ΔA_{410} para cada repetição.

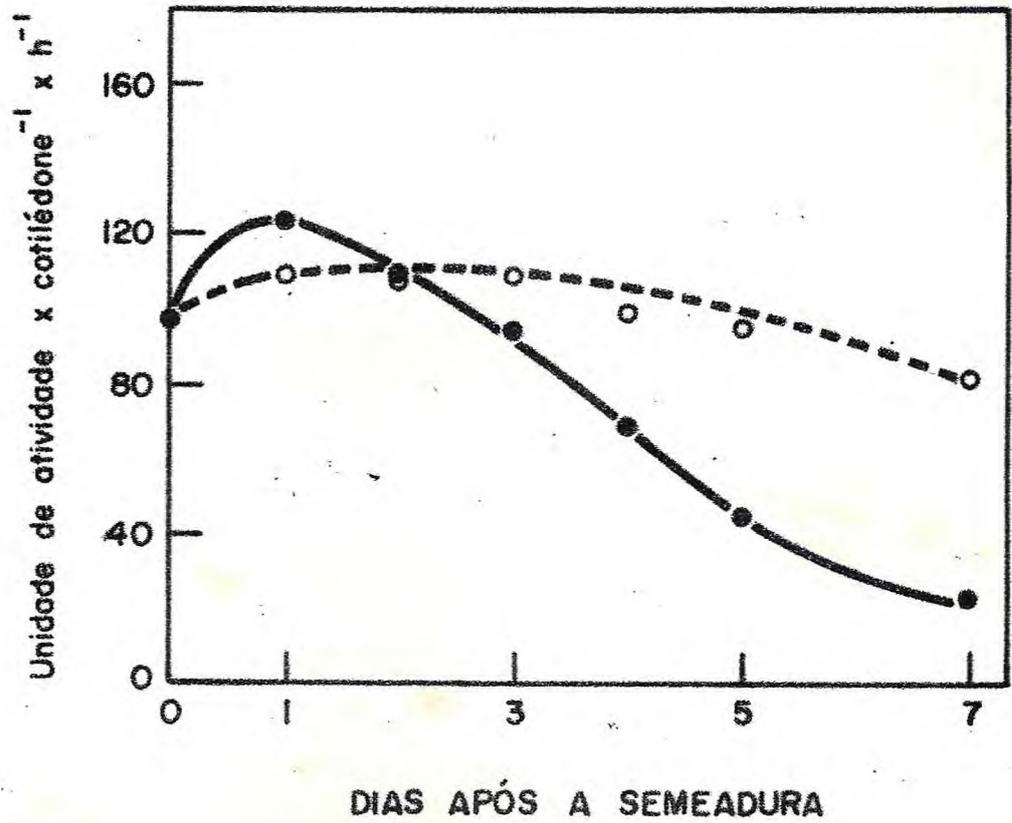


Figura 12 - Atividade peptidásica total de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de cor da pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1 M (o----o).

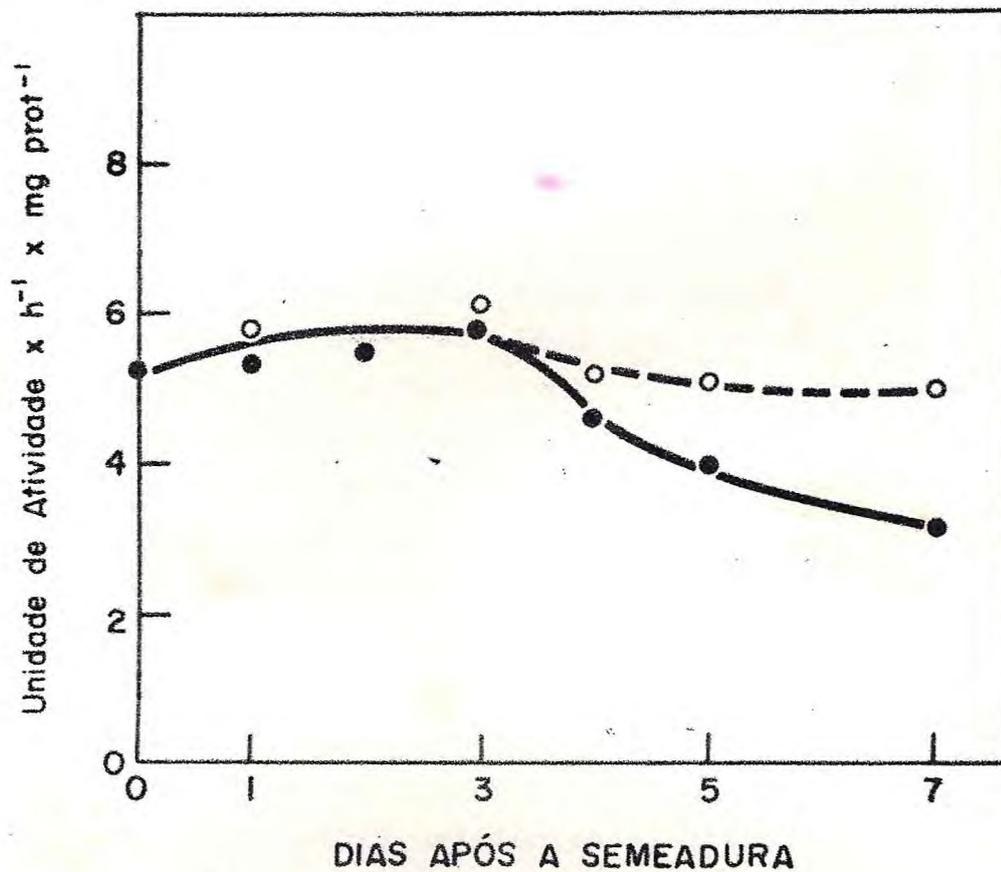


Figura 13 - Atividade peptidásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1 M (o----o).

Experimentos in vitro

Nos experimentos in vitro, a atividade peptidásica total e específica foi determinada em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação (Tabela VI, Figura 14). Esta atividade aumentou à medida que a concentração de NaCl na mistura de reação também aumentou (Figura 14). Tal aumento em atividade foi estatisticamente significativo quando a concentração de NaCl na mistura de reação era igual ou maior que 0,02 M.

Como tais resultados poderiam ser devidos a efeitos do NaCl sobre os produtos de hidrólise, resultantes da ação da LPase, e não sobre a reação enzimática propriamente dita, foi feito um experimento para esclarecer este fato. Isto foi testado pela adição de concentrações crescentes de NaCl, imediatamente após o término da reação enzimática. Os valores de A_{410} apresentados na Figura 15 demonstram que este sal não tem efeito sobre os produtos de hidrólise, resultantes da ação da LPase.

Poderia também ser interpretado que o estímulo na atividade apresentado na Tabela VI e Figura 14 era devido a impurezas (metais pesados) existentes na mistura de reação e não ao NaCl propriamente dito. Isto também foi testado, usando-se EDTA como agente quelante. A figura 16 demonstra que o estímulo na atividade da LPase foi realmente devido ao NaCl. Além disso, o EDTA não exerce nenhum efeito sobre a atividade da LPase.

Atividade ribonucleásica

O estudo da atividade ribonucleásica, da mesma maneira que aquele feito com a protease 6,0 e a LPase, foi precedido da determinação das condições ótimas de ensaio. Para a

TABELA VI. Atividade peptidásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) em função de quantidades crescentes de NaCl na mistura de reação.

Concentração de NaCl na mistura de reação (M)	Atividade total (% do controle)	Atividade específica (% do controle)
0,00	100,0	100,0
0,02	114,3*	114,7*
0,10	129,2*	122,7*
0,18	131,0*	130,9*
0,34	135,9*	135,6*
0,66	145,2*	145,3*

(*) - Valores estatisticamente diferentes (ao nível de 5%) quando comparados com o controle (NaCl 0,00 M) dentro de uma mesma coluna.

Os valores acima são médias de 3 repetições, tendo sido efetuadas 3 leituras de ΔA_{410} para cada repetição.

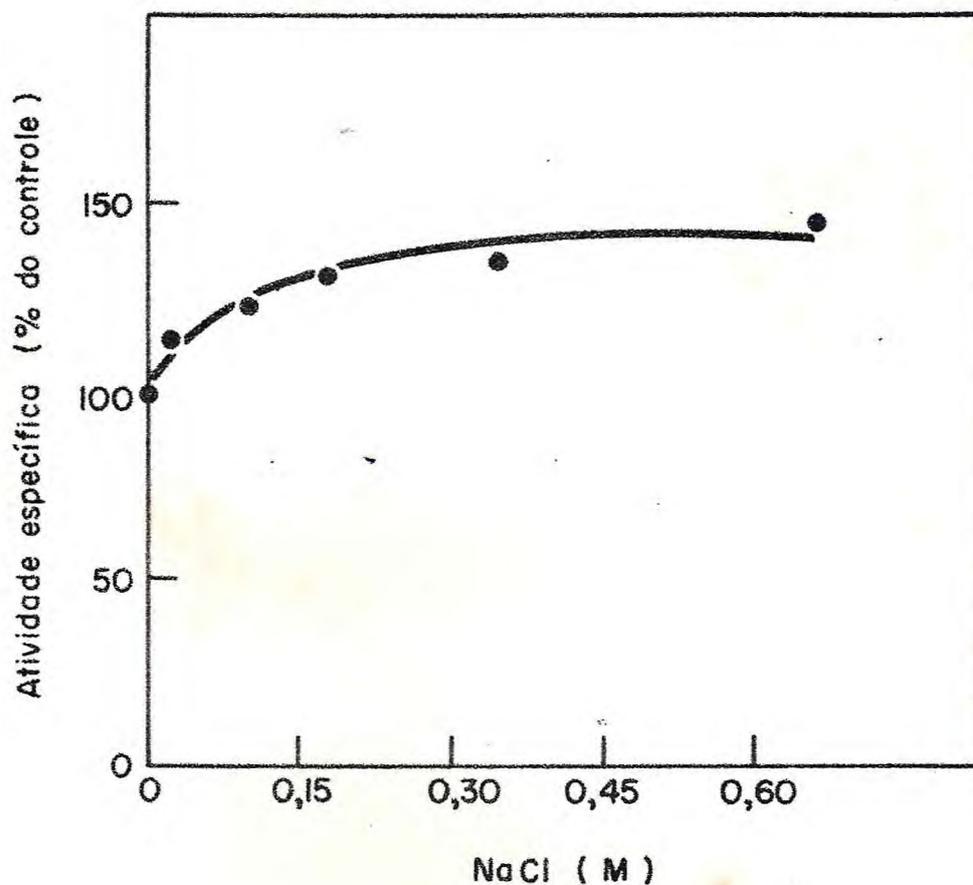


Figura 14 - Atividade peptidásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi) em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação.

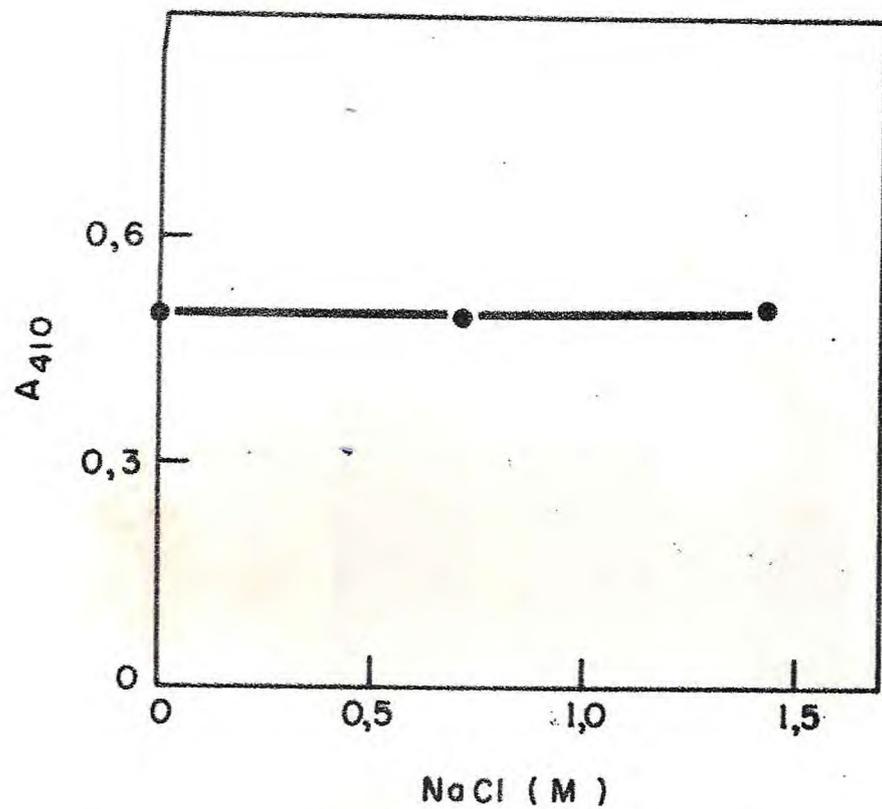


Figura 15 - Efeito do NaCl sobre os produtos de hidrólise da LPase extraída de cotilédones provenientes de se mentes quiescentes de feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi).

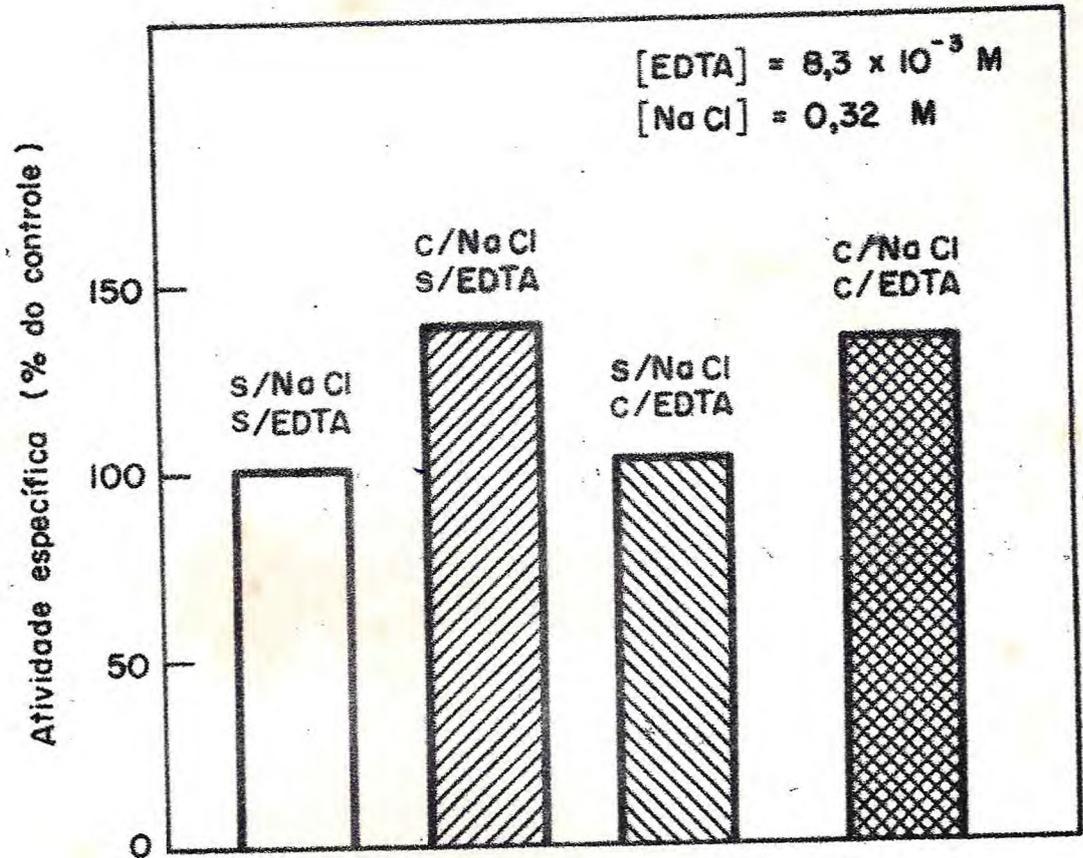


Figura 16 - Efeito da presença de EDTA na mistura de reação sobre a atividade peptidásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi).

RNase, isto foi feito em extratos de cotilédones provenientes de plântulas com 5 dias após a semeadura em água destilada. A atividade ribonucleásica apresentou um máximo em pH 5,2, indicando, portanto, ser este o pH ótimo para essa reação (Figura 17 (A)). Para que a reação enzimática se processasse em excesso de substrato, determinou-se a relação enzima-substrato. Da curva obtida ficou estabelecida a relação de 3 mg de substrato (RNA) para 0,2 ml do extrato diluído 1:2 (v:v) com tampão citrato 0,05 M, pH 5,2, sendo o volume final da reação 2,5 ml (Figura 17 (B)). A atividade enzimática aumentou linearmente em função das crescentes quantidades de extrato (enzima bruta) na mistura de reação (Figura 17 (C)).

Experimentos in vivo

Nestes experimentos, encontrou-se que a atividade ribonucleásica total (Tabela VII, Figura 18) nos cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda semeadas em água (controle) cresceu até o 5º dia após a semeadura, permanecendo constante até o 7º dia, quando começou a decrescer, atingindo no último dia do período estudado um valor 4,6 vezes maior do que aquele apresentado no dia zero. Nos cotilédones oriundos de plântulas do tratamento salino, a atividade ribonucleásica total cresceu até o 7º dia após a semeadura, decrescendo daí até o último dia do período estudado, quando acusou um valor 11,3 vezes maior do que aquele apresentado no dia zero (Tabela VII, Figura 18). A análise estatística mostrou que, entre o 3º e o 5º dia após a semeadura, a atividade ribonucleásica total nos cotilédones do tratamento controle foi sempre maior do que àquela do tratamento salino. Todavia, após o 7º dia, aconteceu o inverso: a atividade ribonucleásica total foi maior nos cotilédones provenientes do tratamento salino (Tabela VII, Figura 18). As atividades ribonucleásicas específicas, tanto em cotilédones derivados do trata-

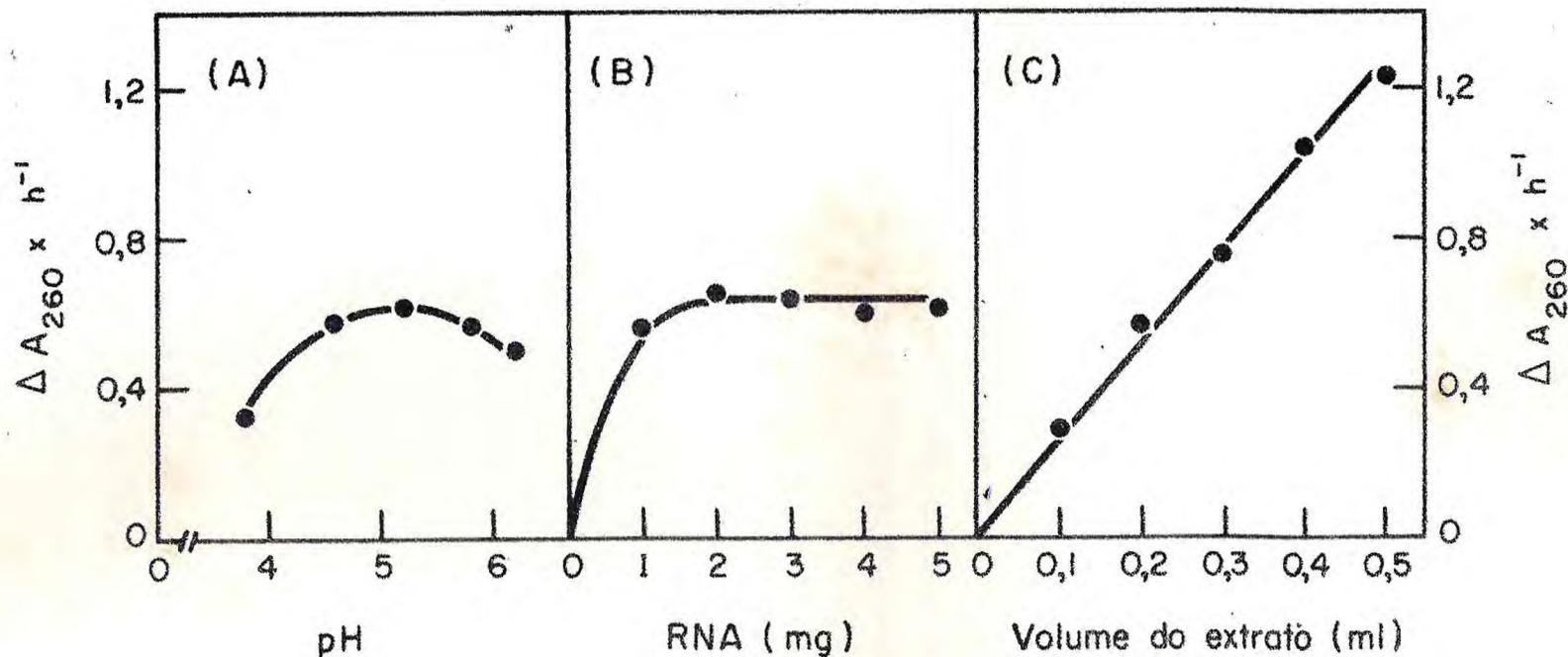


Figura 17 - Características da RNase extraída de cotilédones provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) com 5 dias após a semeadura em água destilada. (A): Curva de pH para o ensaio de atividade ribonucleásica, usando-se RNA como substrato. (B): Curva de atividade ribonucleásica em função de quantidades crescentes de substrato (RNA), sendo o pH da mistura de reação 5,2. (C): Curva de atividade ribonucleásica em função de quantidades crescentes de extrato (enzima bruta). O extrato original em (A), (B) e (C) foi diluído 1:2 (v:v) com tampão citrato 0,05M, pH 5,2.

mento controle como naqueles oriundos do tratamento salino, apresentaram-se crescentes até o 7º dia após a semeadura (Tabela VII, Figura 19). Deste dia até o final do período estudado, a atividade específica nos cotilédones provenientes do tratamento controle apresentou-se decrescente e, no 9º dia após a semeadura, atingiu um valor 12,7 vezes maior do que a a quele apresentado no dia zero. Esta mesma atividade, nos cotilédones do tratamento salino, permaneceu praticamente cons tante do 7º ao 9º dia após a semeadura, quando atingiu um va lor 18,1 vezes maior do que aquele apresentado no dia zero. A análise estatística mostrou que a atividade específica nos cotilédones oriundos do tratamento controle, do 3º ao 7º dia após a semeadura, foi sempre superior àquela obtida em cotilédones derivados do tratamento salino (Tabela VII). Somente no 9º dia após a semeadura, a atividade específica nos cotilédones do tratamento salino foi estatisticamente superior à quella obtida em cotilédones derivados do tratamento contro le.

Dos extratos utilizados para os ensaios de atividade ribonucleásica foram retiradas amostras e feitas as deter minações de proteína. Igualmente àquele estudo feito com a LPase, as concentrações de proteínas, tanto nos extratos de cotilédones oriundos de plântulas do tratamento controle, co mo aquela obtida de plântulas do tratamento salino, tiveram comportamento semelhante àquele apresentado quando do estudo com a protease 6,0 (Figura 6).

Experimentos in vitro

Seguindo a mesma sequência de estudos feitos com a protease 6,0 e a LPase, determinou-se a atividade ribonucleá sica total e específica em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação (Tabela VIII, Figura 20). Esta atividade decresceu à medida que a concentração de NaCl

TABELA VII. Atividade ribonucleásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (C) e em solução de NaCl 0,1 M (S).

Dias após a semeadura	Atividade total ⁽¹⁾		Atividade específica ⁽¹⁾	
	(UA x cot ⁻¹ x h ⁻¹)		(UA x h ⁻¹ x mg prot ⁻¹)	
	C	S	C	S
0	<u>1325</u>	<u>1325</u>	<u>160</u>	<u>160</u>
1	<u>2505</u>	<u>2200</u>	<u>299</u>	<u>267</u>
3	8035	5620	1324	726
5	11625	8550	2634	1447
7	11730	16465	3115	2878
9	6150	15035	2029	2896

(1) - Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

Os valores acima são médias de 3 repetições, tendo sido efetuadas 3 leituras de ΔA_{260} para cada repetição.

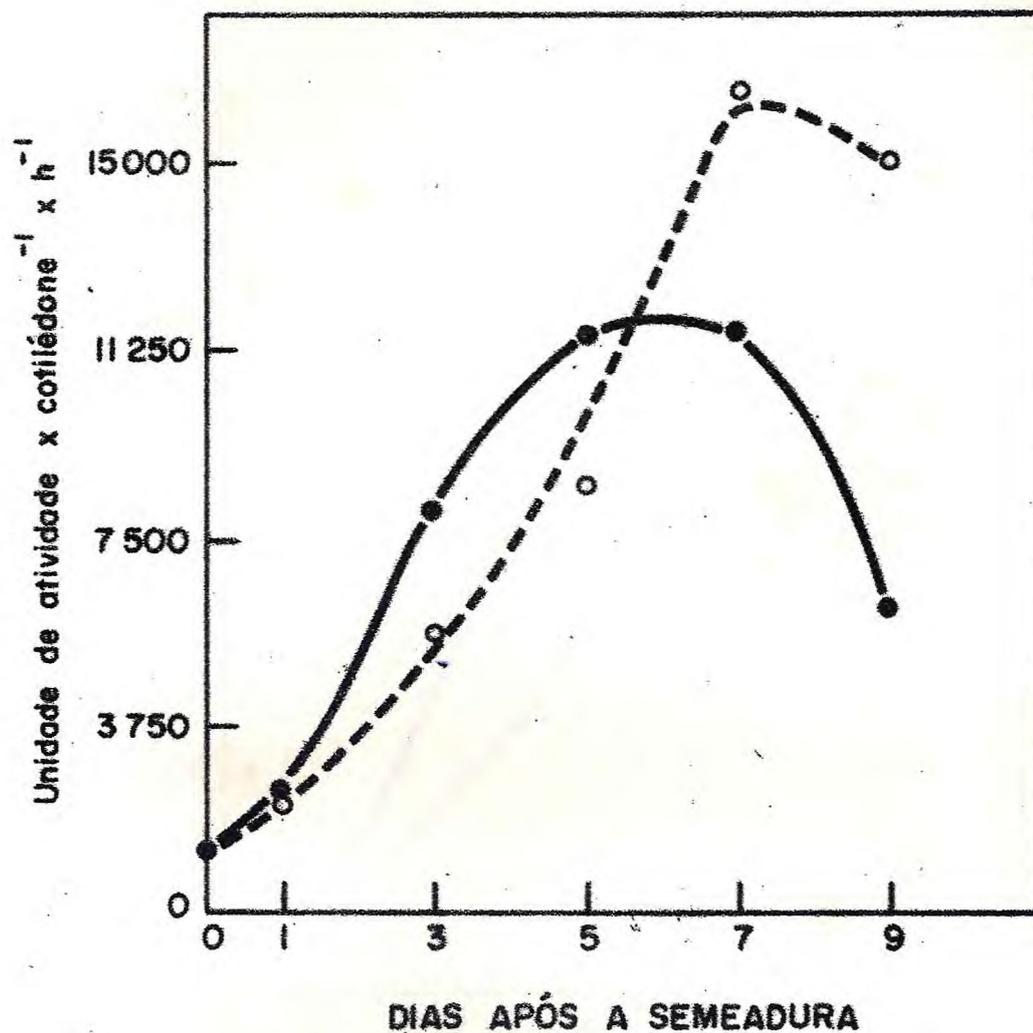


Figura 18 - Atividade ribonucleásica total de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1 M (o----o).

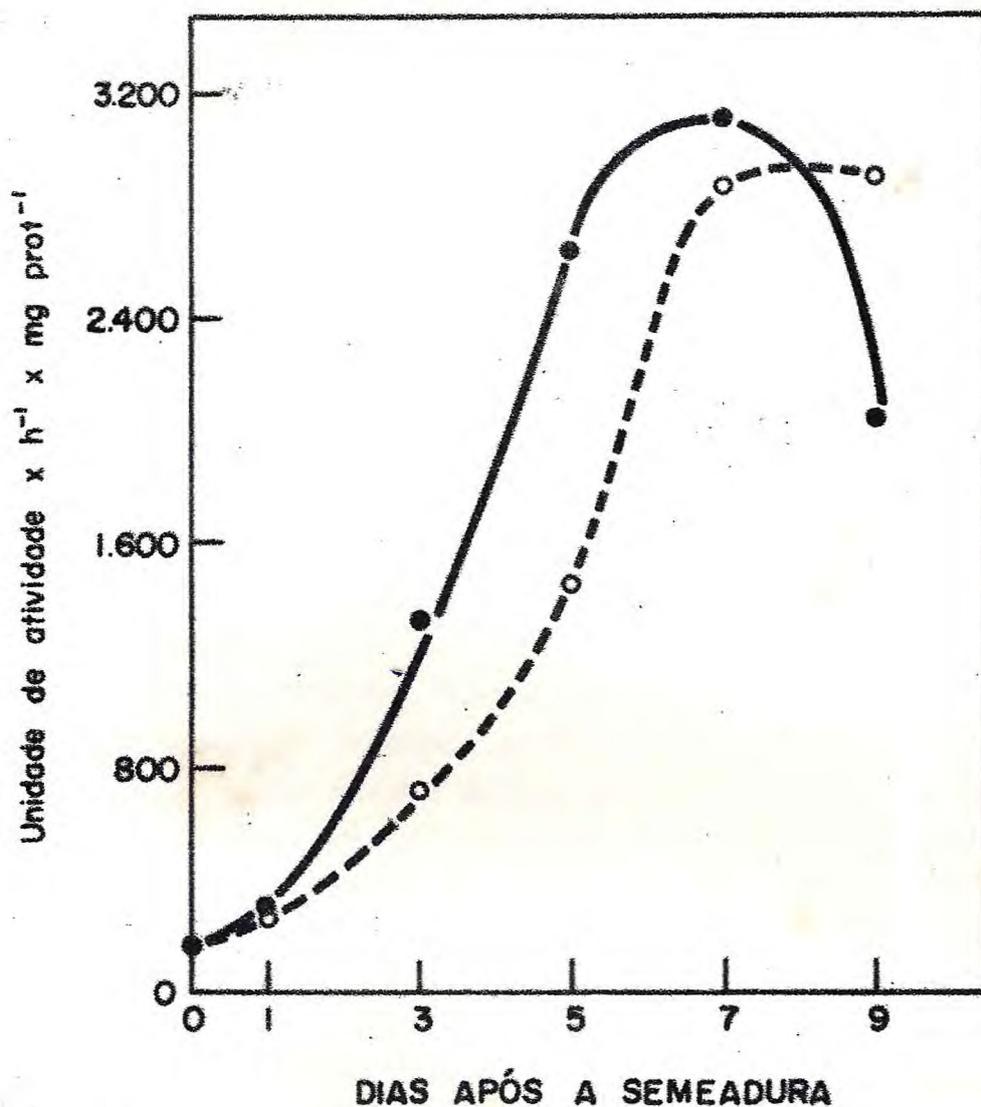


Figura 19 - Atividade ribonucleásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1 M (○----○).

na mistura de reação aumentou (Figura 20). Tal decréscimo em atividade foi estatisticamente significativo quando a concentração de NaCl na mistura de reação era igual ou superior a 0,05 M.

Como esses resultados poderiam ser devidos a efeitos do NaCl sobre os produtos de hidrólise, resultantes da ação da RNase, e não sobre a reação enzimática propriamente dita, foi feito um experimento, semelhante àqueles realizados para a protease 6,0 e a LPase, com o fim de esclarecer o fato. Adicionou-se NaCl logo após o término da reação enzimática e os valores de A_{260} , apresentados na Figura 21, demonstram que este sal não tem efeito sobre os produtos de hidrólise resultantes da ação da RNase.

Poderia também ser interpretado que o decréscimo em atividade apresentado na Tabela VIII e Figura 20 era devido a impurezas (metais pesados) presentes na mistura de reação, e não ao NaCl propriamente dito. Isto também foi testado, usando-se EDTA como agente quelante. A Figura 22 demonstra que a diminuição na atividade da RNase foi realmente devida ao NaCl. Além disso, o EDTA não exerce nenhum efeito sobre a atividade da RNase.

TABELA VIII. Atividade ribonucleásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi) em função de quantidades crescentes de NaCl na mistura de reação.

Concentração de NaCl na mistura de reação (M)	Atividade total (% do controle)	Atividade específica (% do controle)
0,00	100,0	100,0
0,05	94,7*	95,2*
0,10	93,9*	92,9*
0,50	77,7*	76,2*
1,00	64,8*	64,3*

(*) - Valores estatisticamente diferentes (ao nível de 5%) quando comparados com o controle (NaCl 0,00 M) dentro de uma mesma coluna.

Os valores acima são médias de 3 repetições, tendo sido efetuadas 3 leituras de ΔA_{260} para cada repetição.

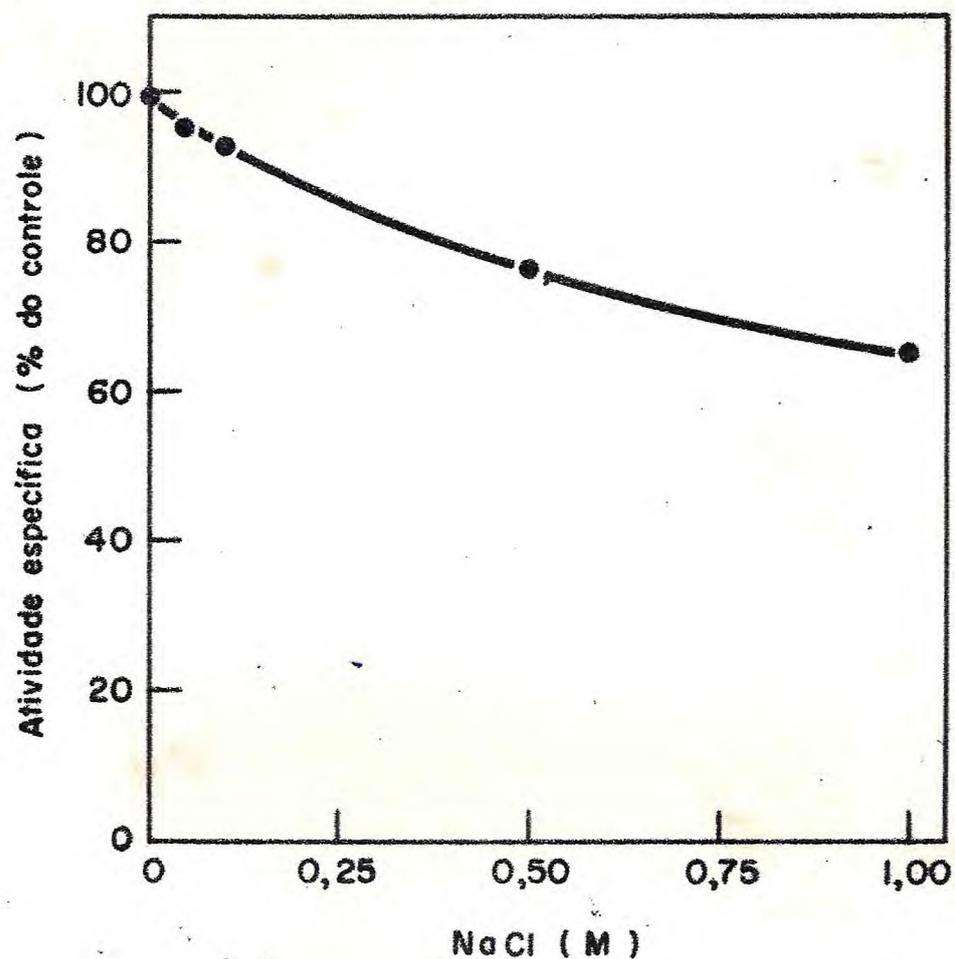


Figura 20 - Atividade ribonucleásica específica de extratos de cotilédones provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi), com 5 dias após a sementeira em água destilada, em função de concentrações crescentes de NaCl na mistura de reação.

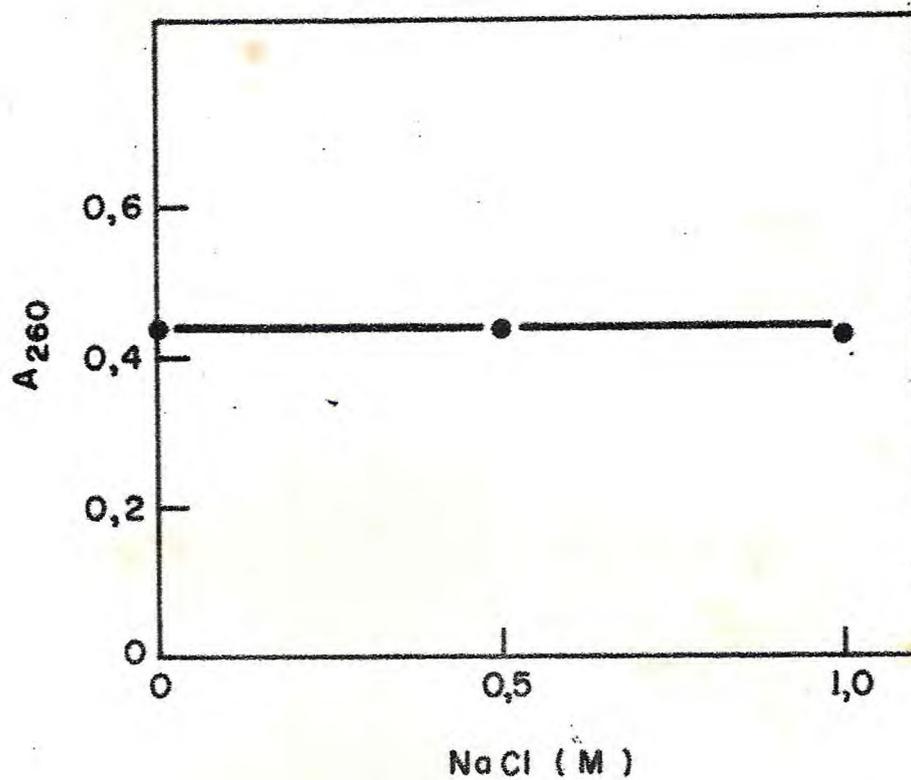


Figura 21 - Efeito do NaCl sobre os produtos de hidrólise da RNase extraída de cotilédones provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi), com 5 dias após a semeadura em água destilada.

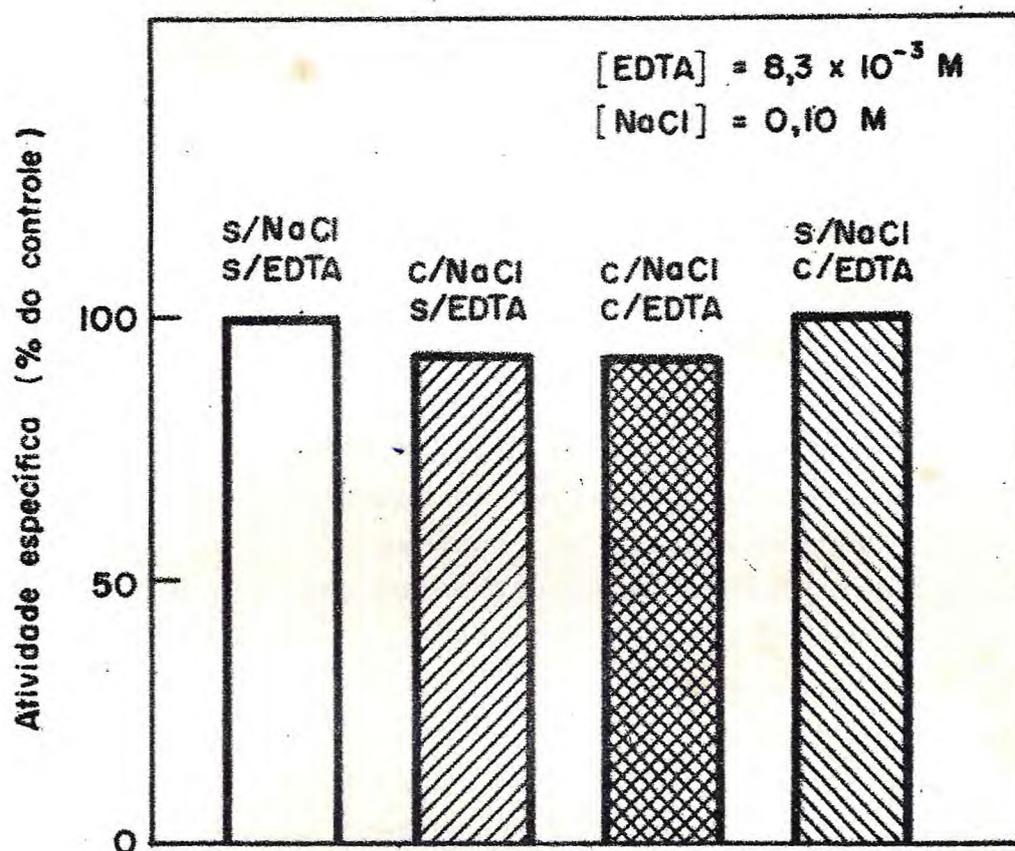


Figura 22 - Efeito da presença de EDTA na mistura de reação sobre a atividade ribonucleásica específica de extratos de cotilédones provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L) Savi), com 5 dias após a semeadura em água destilada.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O processo germinativo tem início com a absorção de água pela semente. No presente estudo, utilizando sementes de feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi), foi verificada, inicialmente, a influência do NaCl neste processo através de seus efeitos no crescimento das plântulas. As medidas de peso fresco e seco de cotilédones e eixos embrionários (Tabelas I e II e Figuras 1 e 2) indicam que a presença do sal no meio de crescimento das plântulas faz com que elas absorvam menos água. Isto foi evidenciado pelo fato do peso fresco dos cotilédones oriundos de plântulas semeadas em água destilada (controle), nos três primeiros dias de germinação, ser sempre maior ou igual ao dos cotilédones provenientes de plântulas semeadas em NaCl 0,1 M (Tabela I, Figura 1). Além disso, durante o período, os pesos secos destes órgãos, nos dois tratamentos, foram iguais e decrescentes (Tabela II, Figura 2), confirmando, portanto, que o aumento observado em peso fresco dos cotilédones era devido à intensa absorção de água pelas sementes no início do processo germinativo. Embora, do 3º dia de germinação em diante o inverso tenha ocorrido, ou seja, o peso fresco dos cotilédones provenientes de sementes controle tenha sido inferior àquele dos cotilédones oriundos de sementes do tratamento salino, o que foi dito acima não fica invalidado porque, neste período, a perda de matéria seca foi maior nos cotilédones do tratamento controle. Este fato e os dados de peso seco dos eixos embrionários sugerem que o NaCl impede que as reservas cotiledonárias sejam mobilizadas e/ou transportadas (Prisco & Vieira, 1976) para esses órgãos da plântula, afetando drasticamente o seu crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores quando estudaram os efeitos do NaCl na germinação de

sementes e no desenvolvimento das plântulas (Uhvits, 1946; Prisco & O'Leary, 1970a; Vieira, 1975).

As condições ótimas de ensaio encontradas para a protease 6,0 (Figura 3) coincidem com aquelas encontradas por Ainouz, et al. (1972) em feijão de corda seridó (Vigna sinensis (L) Savi). A comparação entre as curvas de pH para esses cultivares sugere uma semelhança entre os sistemas caseinolíticos existentes em seridó e pitiúba.

O comportamento da atividade proteolítica total nos cotilédones retirados de sementes semeadas em água destilada foi semelhante ao encontrado por outros autores (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1963; Wiley & Ashton, 1967; Prisco et al., 1975; Prisco & Vieira, 1976). Esta atividade aumentou ligeiramente até o 3º dia de germinação, para, daí em diante, começar a decrescer (Tabela III, Figura 4). O fato da atividade proteolítica ser alta no início do processo germinativo sugere uma importância dessas enzimas hidrolíticas na degradação das proteínas de reserva, porém é difícil a compreensão de sua exata função na semente, pois no 7º dia após a semeadura seu valor ainda é relativamente alto, mesmo quando quase toda a reserva protéica dos cotilédones tem sido exaurida (Beevers & Splittstoesser, 1968). Todavia, tudo leva a crer que a ação inibitória do NaCl na mobilização das reservas protéicas não se faz através de seus efeitos na protease 6,0 (cassinase), visto que os valores de atividade proteolítica total, nos dois tratamentos, não diferiram durante os 3 primeiros dias após a semeadura (Tabela III, Figura 4). Apesar da atividade proteolítica específica (Tabela III, Figura 5) no tratamento salino ter sido sempre menor ou igual àquela do tratamento controle, não invalida o que foi dito, pois tal diferença ocorreu porque a concentração de proteína nos cotilédones do tratamento salino, do 3º dia de germinação em diante, foi sempre superior àquela encontrada para co

tilédones do tratamento controle (Figura 6). O aumento na proteína cotiledonária, no 19 dia de germinação, foi também encontrado por outros autores (Ghetie, 1966; Prisco et al., 1975). Isto parece ser devido ao aumento em extração das proteínas de reserva, como resultado do desprendimento dessas moléculas de seus conjugados nativos (Ghetie, 1966).

O NaCl foi um forte inibidor da protease 6,0, in vitro, apesar de praticamente não ter exercido efeito na atividade desta enzima, nos estudos feitos in vivo. Ao nível de 0,1 M de NaCl, que foi a concentração utilizada nos experimentos in vivo, a inibição observada na atividade proteolítica total foi da ordem de 37,5%, e na atividade específica foi de 33,3% (Tabela IV, Figura 7). Os resultados apresentados na Figura 8 demonstram que a inibição observada não foi motivada por alterações causadas pela presença de NaCl no meio de reação, pois este sal não alterou as leituras de absorbância (A₇₅₀). Além disso, poderia pensar-se que a inibição observada era devida à impurezas (metais pesados) contidas no NaCl usado. Isto foi testado utilizando-se o agente quelante EDTA (Figura 9), que além de não ter sido capaz de evitar a inibição devida ao NaCl, provocou uma diminuição na atividade específica. Embora esta diminuição em atividade possa a rigor ser interpretada como devida à retirada de íons da solução, que estariam funcionando como ativadores, parece que isto ocorreu, principalmente, devido aos efeitos do EDTA sobre o método de Lowry et al. (1951). Este composto causou diminuição nas leituras de absorbância (A₇₅₀), ao se fazer a reação entre uma proteína (albumina) e o reagente de Folin, em presença e ausência de EDTA (Figura 10). Resultados não publicados, utilizando-se o próprio filtrado do ensaio, em presença e ausência deste agente quelante, mostraram que este composto causava uma diminuição nas leituras de absorbância em 750nm. Isto pode ser explicado tendo-se em vista que este composto forma quelante com os íons Cu⁺², interferindo, consequentemente

te, com a reação entre a proteína ou peptídeo e o reagente de Folin (Lowry et al., 1951).

O fato dos resultados encontrados in vitro não corresponderem àqueles obtidos in vivo nos mostra que devemos ser bastante cautelosos ao tentar extrapolar possíveis efeitos de íons inorgânicos sobre a atividade enzimática, in vitro, com aqueles que eventualmente ocorrem in vivo. Esta discrepância em resultados pode ter, pelo menos, duas explicações. Os extratos utilizados para medir a atividade proteolítica foram preparados com tampão fosfato sem NaCl. Além disso, foram feitas diluições adicionais, com o mesmo tampão, antes de se proceder ao ensaio de atividade enzimática, sendo a concentração de NaCl por ocasião do ensaio bastante menor do que aquela existente nos cotilédones antes da extração da enzima. Esta falha na metodologia comumente empregada e de difícil solução pode ser a causadora do não aparecimento dos efeitos inibitórios do NaCl in vivo, uma vez que, in vitro, este sal foi um forte inibidor da protease 6,0 (Tabela IV, Figura 7). Uma outra explicação seria a proposta por Greenway & Osmond (1972). Estes autores acham que as interações dos íons inorgânicos com as enzimas, in vitro, se fazem de uma maneira artificial, isto é: in vitro os íons interagem com as moléculas protéicas em solução aquosa, enquanto que, in vivo, a organização do citoplasma é tal que as enzimas não respondem a tais íons como acontece in vitro. Segundo eles, é possível que as células regulem o meio iônico do citoplasma de tal maneira que as enzimas não são normalmente expostas a altos níveis de sal. Por outro lado, esta enzima encontra-se, principalmente, nos corpos protéicos (Harris & Chrispeels, 1975), dificultando, ainda mais, o contacto direto da mesma com os sais.

A hidrólise do peptídeo sintético L-leucina-p-nitroanilida (LPA) pelos extratos de cotilédones do feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi) demonstra a existência

de peptidases ativas nestes extratos. Presumivelmente uma leucina amino peptidase deve estar presente nestes órgãos de reserva da semente, isto porque o substrato utilizado (LPA) é específico para tal enzima. A presença desta enzima foi também constatada em ervilha (Beevers, 1968; Beevers & Splittstoesser, 1968) e em feijão de corda seridó (Uchoa, 1976). A curva de atividade peptidásica em função do pH e a relação enzima-substrato (Figura 11) foram semelhantes àquelas encontradas por Uchoa (1976). A igualdade em pH ótimo de ensaio para extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda seridó e de feijão de corda pituíba sugere uma semelhança entre os sistemas enzimáticos responsáveis pela hidrólise do LPA existente nesses dois cultivares.

A atividade peptidásica total nos cotilédones oriundos de sementes semeadas em água destilada, durante a germinação, foi semelhante a encontrada em ervilha (Beevers, 1968; Beevers & Splittstoesser, 1968), em feijão "mungo" (Chrispeels & Boulter, 1975) e em feijão de corda seridó (Uchoa, 1976). Esta atividade aumentou até o 1º dia após a semeadura, para, daí em diante, começar a decrescer (Tabela V, Figura 12). É importante ressaltar que o comportamento da atividade peptidásica total foi semelhante àquele da concentração de proteína nos cotilédones (Figura 6). Isto é, à medida que as reservas protéicas nos cotilédones vão se esgotando, a atividade peptidásica total e específica também vai decrescendo (Figuras 6, 12 e 13). Este fato sugere que a LPase é uma enzima que sofre degradação durante a germinação, e, provavelmente, após executar seu papel de enzima hidrolítica torna-se uma reserva de peptídios e aminoácidos, que podem ser utilizados para síntese de novas enzimas nos cotilédones ou serem translocados para o eixo embrionário.

Nos extratos oriundos de cotilédones provenientes de sementes semeadas em solução salina, a atividade peptidásica total variou muito pouco durante o período experimental. Após

o 2º dia de germinação ela foi sempre superior a dos cotilédones obtidos do tratamento controle (Tabela V, Figura 12). Este fato e a observação de que a atividade LPásica no controle decresce mais rapidamente do que no tratamento salino sugere um possível efeito inibitório do NaCl na atividade e/ou síntese do sistema enzimático responsável pela degradação da LPase. Esta hipótese é reforçada quando se observa os efeitos do NaCl na atividade peptidásica específica (Tabela V, Figura 13). Como se pode verificar, esta atividade em cotilédones de sementes semeadas em NaCl variou muito pouco durante a germinação, e após o 3º dia da semeadura ela foi sempre superior a do tratamento controle, apesar da concentração de proteína nos cotilédones de sementes deste tratamento (Figura 6) ser bastante inferior àquela encontrada para o tratamento salino.

O NaCl estimulou a atividade da LPase, in vitro (Tabela VI, Figura 14). Ao nível de 0,1 M de NaCl, que foi a concentração utilizada nos experimentos in vivo, o estímulo em atividade peptidásica total foi da ordem de 29,2% e na atividade específica de 22,7%. Este estímulo não foi devido aos efeitos do NaCl nas leituras de absorbância (A_{410}), pois adições crescentes deste sal, feitas imediatamente após o término da reação enzimática, não mostraram efeito algum nas leituras de absorbância em 410 nm (Figura 15). Também foi demonstrado que o estímulo observado em atividade peptidásica não era devido à presença de impurezas (metais pesados) presentes no NaCl, que poderiam funcionar como ativadores desta enzima, uma vez que a presença do agente quelante (EDTA) na mistura de reação não foi capaz de evitar o aumento em atividade enzimática causado pelo NaCl (Figura 16).

Embora o NaCl haja provocado aumento na atividade LPásica, in vitro (Tabela VI, Figura 14), não podemos afirmar que os valores de atividade mais elevados encontrados in vivo para o tratamento salino, após o 2º dia de germinação (Tabe-

la V, Figura 12), sejam devidos a esse estímulo. Se este fosse o caso, as curvas apresentadas na Figura 12 deveriam ser paralelas, sendo que a curva de atividade peptidásica, referente ao tratamento salino, deveria ficar acima daquela correspondente ao tratamento controle. Como isto não ocorreu, a hipótese de que o NaCl, in vivo, impede que a LPase seja degradada nos parece bastante provável. Uma possível razão para as curvas apresentadas na Figura 12 não terem sido paralelas está associada, como no caso da protease 6,0, à metodologia empregada. Também a hipótese de Greenway & Osmond(1972), discutida anteriormente para a protease 6,0, pode servir, neste caso, como argumento para explicar o não paralelismo observado nas curvas de atividade peptidásica in vivo (Figura 12).

As condições ótimas de ensaio (Figura 17) encontradas para a ribonuclease extraída de cotilédones do feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L) Savi) foram idênticas às encontradas para a RNase extraída de cotilédones de feijão de corda seridô (Vieira, 1975). Isto sugere uma semelhança entre os sistemas enzimáticos responsáveis pela degradação do RNA nestes dois cultivares. O pH-ótimo encontrado para a ribonuclease, entre 5 e 6 (Figura 17(A)), é comparável aos obtidos para RNase de folhas de fumo (Frisch-Niggemeyer & Reddi, 1957), de espinafre (Tuve & Anfinsen, 1960) e de cotilédones de algodão (Leffler, 1974).

A atividade ribonucleásica total (Tabela VII, Figura 18) em cotilédones provenientes de sementes semeadas em água destilada, se mostrou crescente até o 7º dia após a semeadura, quando começou a decrescer. Este comportamento da RNase, juntamente com a observação de que o nível de RNA na semente quiescente é normalmente alto (Beevers & Guernsey, 1966; Palmiano & Juliano, 1972; Vieira, 1975), e decresce à medida que o processo germinativo se desenvolve, sugere que esta enzima é ativada e/ou sintetizada, de novo, pelo menos

até o 5º dia após a semeadura (Vieira, 1975). O comportamento da atividade específica (Tabela VII, Figura 19) foi concordante com aquele da atividade total, reforçando a hipótese de que a RNase é uma enzima que ou sofre síntese de novo ou é ativada. Em suporte a isto, existem vários registros na literatura de aumentos na atividade da RNase nos órgãos de reserva, ao longo da germinação (Palmiano & Juliano, 1972; Vieira, 1975; Leffler, 1976).

Nos cotilédones oriundos de sementes semeadas em NaCl, a atividade ribonucleásica total (Tabela VII, Figura 18) mostrou-se também crescente, porém até o 5º dia após a semeadura seu valor foi sempre igual ou inferior àquele apresentado pelo tratamento controle. Todavia, nos dias 7 e 9 após a semeadura, a situação se inverteu, ou seja, os valores de atividade medidos em cotilédones do tratamento salino foram superiores aos do tratamento controle. Estes resultados parecem indicar que este sal, in vivo, retarda a síntese e/ou ativação da RNase. Reforçando esta hipótese, a atividade ribonucleásica específica (Tabela VII, Figura 19) em cotilédones de sementes do tratamento salino foi sempre igual ou inferior àquela apresentada pelo tratamento controle, exceto no último dia do período estudado.

Nos experimentos in vitro, o NaCl mostrou ser um inibidor relativamente fraco desta enzima. Ao nível de 0,1 M de NaCl, que foi a concentração utilizada nos experimentos in vivo, a inibição em atividade ribonucleásica total foi de 6,1% e em atividade específica de 7,1% (Tabela VIII, Figura 20). A inibição observada in vitro pelo NaCl não foi devida à simples modificações nas leituras de absorbância em 260 nm (Figura 21). Como se pode verificar, adições crescentes deste sal, após o término da reação enzimática, não causaram modificações nas leituras de absorbância (A_{260}). Também demonstrou-se que a inibição observada acima não era devida à presença de íons metálicos presentes no NaCl como impurezas e

que poderiam estar funcionando como inibidores da atividade enzimática, pois o EDTA não foi capaz de vencer a inibição provocada pelo NaCl e sua presença no meio de reação não cau sou alterações nas medidas de atividade da RNase (Figura 22).

Os resultados dos experimentos in vitro (Tabela VIII, Figura 20) são concordantes com os obtidos in vivo (Tabela VII, Figuras 18 e 19), porém não são suficientes para explicar os altos níveis de inibição em atividade observados durante os experimentos in vivo. Desta maneira podemos inferir que o efeito do NaCl in vivo se deve, principalmente, ao retardamento da ativivação e/ou síntese de novo da RNase. A hipótese de inibição na síntese de novo é reforçada pelo fato de se saber que o NaCl é um inibidor da síntese de proteína (Kahane & Poljakoff-Mayber, 1968; Prisco & O'Leary, 1970b).

O efeito do NaCl, in vivo, observado nas três enzimas estudadas, parece ser apenas um reflexo das alterações metabólicas causadas, principalmente, pela baixa absorção de água pelas sementes, quando germinadas em condições salinas (Prisco & O'Leary, 1970a). Por outro lado, é possível que os efeitos do NaCl, in vitro, na atividade enzimática, sejam devidos a aumentos na força iônica da solução, que favorecem ou não a atividade enzimática. Uma outra possibilidade, seria ainda na ação direta dos íons Na^+ ou Cl^- no centro ativo da enzima, provocando modificações favoráveis ou desfavoráveis ao desenvolvimento da atividade catalítica. Além disso, tais interações no centro ativo, podem afetar a relação entre a atividade enzimática e o pH (Weimberg, 1967; Greenway & Osmond, 1972; Greenway & Sims, 1974).

LITERATURA CITADA

- Ainouz, I. L., J. Xavier Filho & E. Gomes Filho. 1972. Atividade proteolítica em sementes de Vigna sinensis cv seridó. Cienc. e Cult., 24: 104.
- Austenfeld, F.- A. 1976. The effect of various alkaline salts on the glycolate oxidase of Salicornia europaea and Pisum sativum in vitro. Physiol. Plant., 36: 82-87.
- Ayers, A. D., Brown, J. W. & C. H. Wadleigh. 1952. Salt tolerance of barley and wheat in soil plots receiving several salinization regimes. Agron. Jour., 44: 307-310.
- 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.
- ↙ Beevers, L. & F. S. Guernsey. 1966. Changes in some nitrogenous components during the germination of pea seeds. Plant Physiol., 41: 1455-1458.
- ✕ Beevers, L. & W. E. Splittstoesser. 1968. Protein and nucleic acid metabolism in germinating peas. J. Exp. Bot., 19: 698-711.
- Black, C. A. 1968. Soil - Plant Relationships. John Wiley & Sons, New York, 792 p.
- Boucaud, J. 1972. Effects du NaCl sur l'activité de la nitrate reductase chez deux variétés halophiles: Suaeda maritima var. macrocarpa. Physiol. Plant., 27: 37-42.

- ↳ Burger, W. C. & H. W. Siegelman. 1966. Location of a protease and its inhibitor in the barley kernel. Physiol. Plant., 19: 1089-1093.
- Carter, D. L. 1975. Problems of salinity in agriculture. In: Ecological Studies Vol.15: Plants in Saline Environments, A. Poljakoff-Mayber and J. Gale, ed. Springer-Verlag, New York pp. 25-35.
- Ching, T. M. 1972. Metabolism of germinating seeds. In: Seed Biology, Vol.II, T. T. Kozlowski, ed. Academic Press, New York pp. 103-218.
- Chrispeels, M. J. & D. Boulter. 1975. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: role of endopeptidase. Plant Physiol., 55: 1031-1037.
- Erlange, B.F., N. Kokowsky & W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 95: 271-278.
- ↳ Evans, H. J. & G. J. Sorger. 1966. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. Ann. Rev. Plant Physiol., 17: 47-76.
- Fedorov, 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.
- Flowers, T. J. 1972a. Salt tolerance in Suaeda maritima (L.) Dum. The effect of sodium chloride on growth, respiration, and soluble enzymes in a comparative study with Pisum sativum L. J. Exp. Botan., 23: 310-321.
- Flowers, T. J. 1972b. The effect of sodium chloride on enzyme activities from four halophyte species of Chenopodiaceae. Phytochemistry, 11: 1881-1886.

- 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.
- Greenway, H. & A.P.Sims. 1974. Effects of high concentrations of KCl and NaCl on responses of malate dehydrogenase (decarboxylating) to malate and various inhibitors. Aust. J. Physiol., 1: 15-29.
- 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.
- Harris, N. & M. J. Chrispeels. 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. Plant Physiol., 56: 292-299.
- 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.
- Kalir, A. & A. Poljakoff-Mayber. 1975. Malic dehydrogenase from Tamarix roots. Effects of sodium chloride in

- vivo and in vitro. Plant Physiol., 55: 155-162.
- 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.
- Kylin, A. & R. S. Quatrano. 1975. Metabolic and biochemical aspects of salt tolerance. In: Ecological Studies Vol.15: Plants in Saline Environments, A. Poljakoff-Mayber and J. Gale, ed. Springer-Verlag, New York pp. 147-167.
- Lawrence, J. M., K. M. Day & J. S. Stephenson. 1959. Nitrogen mobilization in pea seedlings. Plant Physiol., 34: 668-674.
- Leffler, H. R. 1974. Nuclease activity in germinating cotton seedlings. (Abstr.) p.51. Proc.1974. Beltwide cotton Prod. Res.Conf.Publ.National Cotton Council, Memphis, TN 38112. Citado em: Leffler, H. R. 1976.
- Leffler, H. R. 1976. Altered development of ribonuclease activity and formation of polyribosomes in chilled cotton cotyledons. Crop. Science, 16: 71-75.
- 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.
- Mayer, A. M. & A. Poljakoff-Mayber. 1963. The Germination of Seeds. Pergamon Press, New York, 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.
- Osmond, C. B. & H. Greenway. 1972. Salt responses of carboxylation enzymes from species differing in salt tolerance. Plant Physiol., 49: 260-263.
- Palmiano, E. P. & B. O. Juliano. 1972. Biochemical changes in

the rice grain during germination. Plant Physiol., 49: 751-756.

Pizarro, F. 1975. Salinidad en los Perímetros Irrigados del Nordeste de Brasil. Trabalho apresentado no III Seminário de Irrigação e Drenagem. Fortaleza, Ceará, Brasil. (Mimeografado). 27 p.

↘ 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.

Prentice, N., W.C. Burger & E. Wiederholt. 1969. Distribution of acidic and neutral peptidases in germinating barley. Physiol. Plant., 22: 157-160.

↘ Prisco, J. T. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins of salt and water stressed embryo-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.

Prisco, J. T. & G. H. F. Vieira. 1976. Effects of NaCl salin

- ity on nitrogenous compounds and proteases during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant., 36: 317-320.
- ↘ Puzstai, A. & I. Duncan. 1971. Changes in proteolytic enzyme activities and transformation of nitrogenous compounds in the germinating seeds of kidney bean (Phaseolus vulgaris). Planta (Berl.), 96: 317-325.
- Rausser, W. E. & J. B. Hanson. 1966. The metabolic status of ribonucleic acid in soybean roots exposed to saline media. Can. J. Bot., 44: 759-776.
- Richards. L.A. 1954. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils. U.S.D.A. Agric. Handbook. N° 60, 160 p.
- Simon, E.W. & A. Meany. 1965. Utilization of reserves in germinating Phaseolus seeds. Plant Physiol., 40: 1136-1139.
- Snedecor, G.W. 1956. Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. The Iowa State College Press, Ames, Iowa U.S.A. 534 p.
- ↘ 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.
- Uchoa, A. A. 1976. Atividade LPAásica em sementes de feijão de corda Vigna sinensis (L) Savi c. v. seridó. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brasil. No prelo.
- Uhvits, R. 1946. Effect of osmotic pressure on water absorption and germination of alfalfa seeds. Amer. J. Bot., 33: 278-285.

- Vieira, G. H. F. 1975. Efeitos da Salinidade na Mobilização de Reservas Nitrogenadas do Feijão de Corda Seridó (*Vigna sinensis* (L) Savi) Durante a Germinação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brasil. 52 p.
- Webb, K. L. & J. W. A. 1965. Dark fixation of $^{14}\text{CO}_2$ by obligate and facultative salt marsh halophytes. Can. J. Botan., 43: 281-285. Citado por Kylin, A. & R. S. Quatrano: 1975.
- 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.
- Williams, D. A. 1971. A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.
- 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.

A N E X O

TABELA IX - Estimativa dos quadrados médios dos resultados apresentados nas Tabelas I e II, tendo por base um delineamento hierárquico com dois fatores, sendo o número de repetições igual a 3.

Fator de variação	V A R I Á V E I S							
	Peso fresco				Peso seco			
	Cotilédone		Eixo embrionário		Cotilédone		Eixo embrionário	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Dias	3	4.071,3	3	997.355,7	3	2.755,7	3	3.688,0
Salinidade	4	4.313,6	4	649.681,1	4	1.009,4	4	1.494,8
Sal.(19dia)	1	487,8	1	5,0	1	6,8	1	0,1
Sal.(39dia)	1	159,1	1	26.907,2	1	9,4	1	102,5
Sal.(59dia)	1	4.565,0	1	612.481,5	1	1.633,5	1	1.954,8
Sal.(79dia)	1	12.042,2	1	1.959.330,6	1	2.388,0	1	3.921,9
Erro	16	64,1	16	586,5	16	7,2	16	7,1

TABELA X - Estimativa dos quadrados médios dos resultados apresentados nas Tabelas III, V e VII, tendo por base um delineamento hierárquico com dois fatores, sendo o número de repetições igual a 3.

Fator de variação	V A R I Á V E I S											
	Atividade proteolítica				Atividade peptidásica				Atividade ribonucleásica			
	total		específica		total		específica		total		específica	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Dias	3	0,92	3	0,0367	5	3.641,8	5	3,12	4	117.592.425	4	7.233.210
Salinidade	4	0,19	4	0,0288	6	1.814,4	6	1,33	5	35.023.275	5	773.344
Sal.(19dia)	1	0,00	1	0,0001	1	309,6	1	0,41	1	139.500	1	1.555
Sal.(29dia)	1	11,5	1	0,00
Sal.(39dia)	1	0,00	1	0,0030	1	362,9	1	0,13	1	8.748.450	1	536.645
Sal.(49dia)	1	1.360,8	1	0,58
Sal.(59dia)	1	0,01	1	0,0640	1	3.672,0	1	1,88	1	14.183.550	1	2.115.591
Sal.(79dia)	1	0,76	1	0,0480	1	5.165,3	1	4,97	1	33.630.300	1	85.395
Sal.(99dia)	1	118.414.800	1	1.127.534
Erro	16	0,05	16	0,0003	24	46,1	24	0,10	20	259.425	20	11.938

... - situações onde não foram feitas observações.

TABELA XI - Estimativa dos quadrados médios do erro dos resultados apresentados nas Tabelas IV, VI e VIII, tendo por base um delineamento inteiramente ao acaso, sendo o número de repetições igual a 3.

Fator de variação	V A R I Á V E I S											
	Atividade proteolítica				Atividade peptidásica				Atividade ribonucleásica			
	total		específica		total		específica		total		específica	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Tratamento	5		5		5		5		4		4	
Erro	12	13,007	12	31,534	12	12,516	12	0,174	10	4,453	10	3,781