

DESENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL NOS PRIMEIROS  
ESTÁGIOS DA GERMINAÇÃO DE FEIJÃO DE CORDA  
(*Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridõ).

TEREZINHA PEREIRA DE JESUS

---

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 8 0

*Esta dissertação foi apresentada 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.

\_\_\_\_\_  
TEREZINHA PEREIRA DE JESUS

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

\_\_\_\_\_  
MARIA DA GUIA SILVA LIMA  
Orientadora da Dissertação.

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
JOSE XAVIER FILHO

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
RENATO DE AZEVEDO MOREIRA

\_\_\_\_\_  
Data



Aos meus pais e irmãos

## AGRADECIMENTOS

De modo especial sou grata à professora MARIA DA GUIA SILVA LIMA, pela orientação e estímulo permanentes na execução deste trabalho, bem como aos professores JOSÉ XAVIER FILHO e RENATO DE AZEVEDO MOREIRA.

Agradeço à Dra. NANCY DERRICK DENSLOW, que contribuiu com a execução do trabalho de determinação de perfil enzimático, e forneceu importantes sugestões durante a realização desta dissertação.

Sou grata ao professor P.V. VIGNAIS pela oportunidade que proporcionou para que fossem determinados os espectros da cadeia mitocondrial no Laboratório de Bioquímica do Centro de Estudos Nucleares de Grenoble -- França.

Agradeço aos professores JOSÉ TARQUÍNIO PRISCO e LUIZ GONZAGA REBOUÇAS FERREIRA e à professora IRACEMA L. AINOZ pelas sugestões e esclarecimentos durante a realização desta dissertação.

Estendo meus agradecimentos a todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará pela orientação e apoio recebidos durante a realização desta dissertação.

Aos meus colegas sou especialmente grata pelo incentivo e colaboração dispensados durante a execução deste estudo.

A minha gratidão enfim a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças a cooperações das seguintes instituições:

Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsa de Demanda Social.

Universidade Federal do Ceará, através de financiamento ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, dentro do Projeto Nordeste da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade, em cujos laboratórios foram realizados os trabalhos experimentais desta dissertação.

Universidade Federal de Alagoas através da concessão de liberação para realização deste estudo.

## ÍNDICE

	PÁGINA
LISTA DE DIAGRAMAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	01
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Condições de embebição e germinação.....	15
Determinação do aumento no peso fresco.....	16
Preparação mitocondrial.....	17
Dosagem de proteínas.....	21
Purificação em gradiente linear de densidade de sacarose.....	21
Espectro diferencial da cadeia citocrômica....	23
Determinação da atividade da citocromo-oxidase .	25
Determinação da atividade da malato-desidro- genase.....	26
Determinação da atividade da catalase.....	27
Atividades oxidativa e fosforilante.....	28
Cálculo do consumo de oxigênio.....	28
Cálculo do controle respiratório (C.R.)...	29
Cálculo da relação ADP/O.....	30
RESULTADOS.....	31
Caracterização funcional da fração mitocondri- al isolada de sementes e eixos embrionários quiescentes.....	31
Absorção de água pelas sementes.....	40



# Í N D I C E (continuação)

	PÁGINA
Caracterização funcional da fração mitocondrial isolada de eixos embrionários de sementes embebidas.....	43
Atividade oxidativa.....	43
Atividade fosforilante.....	44
<i>Espectros diferenciais da cadeia citocrômica...</i>	65
Perfil enzimático da fração mitocondrial de sementes quiescentes purificada após centrifugação em gradiente linear de densidade de sacarose.....	72
Caracterização funcional da fração mitocondrial isolada de cotilédones de sementes embebidas..	75
DISCUSSÃO.....	89
CONCLUSÕES.....	98
LITERATURA CITADA.....	99
PUBLICAÇÕES.....	107

## LISTA DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA		PÁGINA
I	Esquema de centrifugação diferencial para o isolamento de mitocôndrias.....	20
II	Preparo de gradiente linear de densidade de sacarose.....	22

## LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
I	Consumo de oxigênio, medido polarograficamente, de mitocôndrias de sementes quiescentes, em presença de diferentes substratos.....	33
II	Valores das relações de C.R. e ADP/O de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes e embebidas, durante a oxidação do succinato, na presença e ausência de citocromo c.....	56
III	Valores das relações de C.R. e ADP/O de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes e embebidas, durante a oxidação do NADH, na presença e ausência de citocromo c.....	57
IV	Valores das relações de C.R. e ADP/O de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes e embebidas, durante a oxidação de L-malato, na presença e ausência de citocromo c.....	58
V	Identificação dos picos de absorção dos espectros diferenciais de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes.....	68
VI	Identificação dos picos de absorção dos espectros diferenciais de mitocôndrias de hipocótilos.....	71

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		PÁGINA
01	Padrão trifásico de absorção de água por sementes germinantes.....	01
02	Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de sementes quiescentes, em ausência e presença de citocromo c, com succinato como substrato, mostrando os efeitos do ADP, oligomicina, FCCP e KCN.....	34
03	Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes em presença de succinato, NADH e L-malato, mostrando o efeito do ADP e KCN.....	36
04	Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários quiescentes em presença de citocromo c, durante a oxidação do succinato, NADH e L-malato, mostrando o efeito do ADP.....	38
05	Curva de variação de peso fresco de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição.....	41
06	Consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição, na oxidação de NADH, succinato e L-malato, na ausência de citocromo c.....	46



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES (Continuação)

FIGURA		PÁGINA
07	Traçado polarográfico de consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes com 64 horas de embebição, em presença de succinato, NADH e L-malato, mostrando o efeito do KCN....	48
08	<i>Consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição, na oxidação de NADH, succinato e L-malato, na presença de citocromo c.....</i>	50
09	Respiração estimulada pelo citocromo c de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição, tendo succinato como substrato.....	52
10	Respiração estimulada pelo citocromo c de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição, tendo NADH como substrato.....	54
11	Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes com 55 horas de embebição, na presença de succinato, NADH e L-malato, mostrando o efeito do FCCP...	59

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES (Continuação)

FIGURA		PÁGINA
12	Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes com 64 horas de embebição, na presença de succinato, NADH e L-malato, mostrando o efeito do FCCP...	61
13	Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes com 64 horas de embebição, na presença de succinato, NADH e L-malato, mostrando o efeito da oligomicina, e reversão da inibição pelo FCCP.	63
14	Espectros diferenciais da cadeia citocrômica de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes.....	66
15	Espectros diferenciais da cadeia citocrômica de mitocôndrias de hipocótilos.	69
16	Distribuição do conteúdo proteico, atividades citocromo-oxidásica, malato-desidrogenásica e catalásica, após centrifugação em gradiente linear de densidade de sacarose (35-65%) da fração mitocondrial de sementes quiescentes.....	73

## INTRODUÇÃO

A atividade metabólica em sementes quiescentes é sabidamente muito baixa (Öpik & Simon, 1963; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1963; Breidenbach *et al.*, 1967; Srivastava & Paulson, 1968; Abdul-Bak, 1969; Kollöffel, 1970; Wilson & Bonner, 1971; Nawa & Asahi, 1971; Paul & Mukherji, 1973; Sato & Asahi, 1975), relacionando-se este fato a uma diminuição considerável do teor de água das sementes que chega a níveis de 5% a 10% (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1966). O papel preponderante desempenhado pela água é evidenciado quando sementes quiescentes viáveis são embebidas, verificando-se que a embebição corresponde o desencadeamento da atividade respiratória, o aparecimento de síntese protéica e demais atividades biológicas. A germinação, determinada pela emergência da radícula, é pois diretamente relacionada com a hidratação das sementes (Öpik & Simon, 1963), esta considerada como fase inicial do processo (Bewley & Black, 1978).

Segundo Bewley & Black (1978), sob condições ótimas de germinação, as sementes mostram um padrão trifásico de absorção de água, como indica a figura 01.

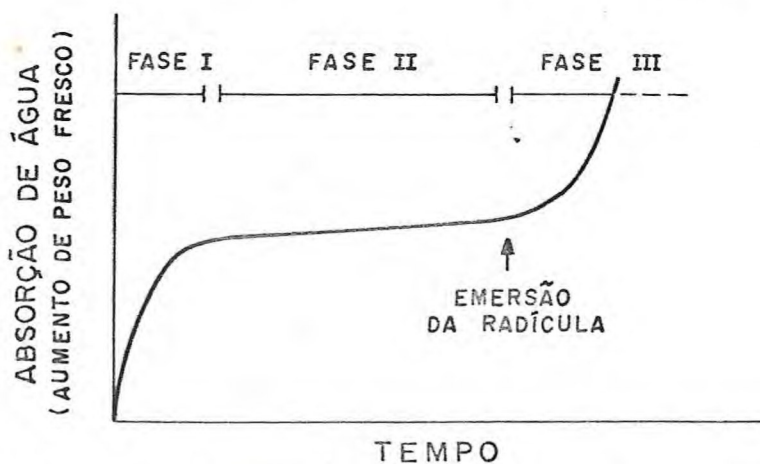


Fig. 01. Padrão trifásico de absorção de água, por sementes germinantes, segundo Bewley & Black (1978).



As fases de absorção de água têm sido relacionadas ao estado metabólico da semente germinante, da seguinte maneira (Bewley & Black, 1978):

FASE I (embebição), caracterizada pela absorção rápida de água, ocorre igualmente em tecidos vivos e mortos, sendo portanto, independente da atividade metabólica da semente, embora o metabolismo comece rapidamente como uma consequência da hidratação;

FASE II (*lag period*), é o período de não absorção de água, com metabolismo ativo de preparação para a germinação. É um período de inércia em sementes mortas;

FASE III, está associada com a germinação e subsequente crescimento. Durante o crescimento há também atividade metabólica, incluindo o começo da mobilização de reservas.

O processo germinativo é o resultado do crescimento do eixo embrionário que, rompendo o tegumento da semente, provoca a emergência da radícula e desencadeia os demais processos morfo-fisiológicos, que culminarão com o estabelecimento da plântula (Walton, 1966). Como a germinação inclui crescimento e divisão celulares, os quais são processos que requerem energia, é óbvio que a germinação é um processo dependente de energia. No entanto, não



estã bem esclarecido quais são as fontes iniciais da energia disponível para a germinação das sementes e quais são as rotas metabólicas aĩ envolvidas.

Em termos gerais, a energia metabólica é fornecida através de duas vias específicas, conforme o organismo considerado seja aeróbico ou anaeróbico. Os organismos aeróbicos obtêm a maior parte de sua energia a partir da respiração, que é definida como a oxidação de combustíveis orgânicos pelo oxigênio molecular, servindo o oxigênio como acceptor final de elétrons. O transporte de elétrons até o oxigênio molecular ocorre através da cadeia respiratória, com um decréscimo da energia livre, parte da qual é conservada pela fosforilação do ADP produzindo ATP, no processo de fosforilação oxidativa. Acoplada à respiração, a fosforilação oxidativa é fundamental para o desempenho vital dos seres aeróbicos, porque é a sua principal fonte de energia útil. O centro da respiração celular em animais e vegetais é a mitocôndria, que contem sistemas enzimáticos capazes não só de dirigir o transporte de elétrons acoplado à fosforilação do ADP, como também de gerar poder redutor, através do ciclo do ácido tricarboxílico (Lehninger, 1970).

Os organismos anaeróbicos, ao invés de oxigênio usam outras moléculas como aceptores de elétrons,

em reações produtoras de energia. A glicólise, degradação anaeróbica da glicose, é uma das inúmeras vias catabólicas através das quais muitos organismos extraem energia química de vários combustíveis orgânicos na ausência de oxigênio molecular. Muitas células, conhecidas como facultativas, podem viver aeróbica ou anaerobicamente, usando oxigênio molecular quando disponível, ou na sua ausência outros compostos como aceptores de elétrons. A maioria das células heterotróficas, especialmente dos organismos superiores, é facultativa, preferindo usar o oxigênio, uma vez que isto lhes permite a utilização mais econômica das moléculas combustíveis (Lehninger, 1970).

As mitocôndrias de origem animal, conquanto se assemelhem a mitocôndrias de vegetais, apresentam diferenças na natureza do sistema de transporte de elétrons, na atividade do ciclo do ácido tricarboxílico e na morfologia das membranas mitocondriais (Ikuma, 1972 ; Palmer, 1976). A organização da cadeia respiratória em mitocôndrias de plantas, parece ser mais complexa do que a que opera em mitocôndrias de mamíferos. A clássica ilustração desta complexidade é a presença de uma oxidase cianeto-resistente, daí decorrendo uma cadeia alternada de transportadores de elétrons. Também a organização da NADH-desidrogenase em mitocôndrias vegetais é mais complexa do que em animais o que confere a estas mitocôndrias a capacidade de oxidar NADH exógeno. Além disso, as mitocôndrias de plantas frequentemente oxidam malato na ausência de um sistema que remove oxalacetato. Em geral, mitocôndrias de animais são incapazes de desenvolver processos similares (Palmer, 1976).



Estas diferenças entre mitocôndrias de animais e de vegetais, se referem a tecidos adultos.

Os tecidos vegetais no estado quiescente ou no curso do processo germinativo, apresentam complexidade. Os estudos com mitocôndrias de sementes ou parte das mesmas no estado quiescente ainda não é muito avançado e muitos dados, pelos variados processos de isolamento da tração mitoconarial, são controvertidos.

Existem vários trabalhos (Kollöffel & Sluys, 1970; Nawa & Asahi, 1971; Solomos *et al.*, 1972; Nawa & Asahi, 1973; Sato & Asahi, 1975), que dizem respeito ao comprometimento do sistema mitocondrial, no aumento do consumo de oxigênio das sementes, durante a germinação. A aparente correlação entre o desenvolvimento da atividade mitocondrial e a capacidade oxidativa aumentada após o início da absorção de água pelas sementes pode ser justificada pelos seguintes fatos:

1) durante a germinação aumenta a eficiência de oxidação de substratos pelas mitocôndrias (Howell, 1961; Cherry, 1963; Breidenbach *et al.*, 1966; Kollöffel & Sluys, 1970; Wilson & Bonner, 1971);

2) as membranas das mitocôndrias tornam-se mais claramente definidas e o número de cristas aumenta durante a germinação (Cherry, 1963; Srivastava & Paulson, 1968);

3) ocorre aumento do número de mitocôndrias durante a germinação (Cherry, 1963; Breidenbach *et al.*, 1966; Kollöffel & Sluys, 1970).

A hipótese do desenvolvimento mitocondrial induzido pela embebição tem encontrado apoio, sobretudo em

estudos de microscopia eletrônica. Cherry (1963) demonstrou a ocorrência de poucas mitocôndrias típicas e muitas membranas vesiculares em preparação mitocondrial de cotilédones quiescentes de *Arachis hypogaea*. Todavia, a estrutura mitocondrial mais diferenciada, tornava-se evidente durante a germinação. Outras modificações significativas das mitocôndrias que indicam sua estabilização durante a embebição foram detectadas por Nawa & Asahi (1971), quando estudaram o desenvolvimento de mitocôndrias de cotilédones de ervilha nos estágios iniciais da germinação. Eles observaram o comportamento das mitocôndrias após separação por centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. A densidade das mitocôndrias mudou durante a embebição e houve aumento na atividade respiratória, nos valores das relações de C.R. e ADP/O e nas atividades das enzimas citocromo-oxidase e malato-desidrogenase e nos conteúdos de proteínas e lipídios. Estes resultados sugeriram a transformação de partículas vesiculares em mitocôndrias funcionantes, enquanto a semente absorveu água.

Vários estudos têm demonstrado que ocorre desenvolvimento mitocondrial durante a germinação (Cherry, 1963; Breidenbach *et al.*, 1966, 1967; Nawa & Asahi, 1971), no entanto pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos no desempenho inicial das mitocôndrias. Nawa & Asahi (1971) sugerem que o desenvolvimento mitocondrial em cotilédones de ervilha durante a embebição ocorre em duas fases. Na primeira fase haveria um rápido aumento nas atividades enzimáticas e na segunda fase ocorreria um aumento na atividade respiratória, e conteúdos de lipídios e proteínas.

Mitocôndrias de cotilédones de sementes quiescentes de ervilha Alaska apresentaram-se enzimaticamente



deficientes, com baixos níveis de malato-desidrogenase e citocromo-oxidase (Nawa & Asahi, 1971). No entanto, durante a fase inicial de embebição, foi verificado um rápido aumento nas atividades destas duas enzimas. Após seis horas de embebição, houve um gradual aumento na atividade da malato-desidrogenase, enquanto a atividade da citocromo-oxidase atingiu um *plateau*. Ainda no que diz respeito às modificações das atividades enzimáticas ocorridas no processo germinativo, Cherry (1963) encontrou aumento nas atividades da succinato-desidrogenase e da citocromo-oxidase durante a germinação em mitocôndrias isoladas de cotilédones de *Arachis hypogaea*. A atividade da succinato-desidrogenase aumentou mais de 8 vezes até o 15º dia de germinação. A citocromo-oxidase também aumentou a atividade até o 13º dia de germinação, seguindo-se uma rápida perda de atividade no 15º dia. Nestas mitocôndrias as alterações nas atividades enzimáticas não acompanharam as mudanças na atividade respiratória pois a respiração mitocondrial com succinato como substrato nitidamente aumentou com a germinação, atingindo um pico de atividade no 8º dia, decrescendo em seguida.

Alterações nas atividades de algumas enzimas mitocondriais de cotilédones de ervilha (*Pisum sativum* L. cv. "Rondo") também foram estudadas durante a maturação (Kollöffel, 1970) e a germinação de sementes (Kollöffel & Sluys, 1970). Durante a maturação verifica-se uma perda parcial das atividades das enzimas mitocondriais. Quando na maturação da semente há um decréscimo de conteúdo de água de 55% para 13% ocorre um acentuado decréscimo, em torno de 90%, das atividades dos sistemas de succinato e malato-oxidases, enquanto que as correspondentes atividades desidrogenásicas decrescem muito pouco, 40 e 10% para succinato e malato-desidrogenase respectivamente. Durante

a germinação, as enzimas mitocondriais são reativadas pela hidratação (Kollöffel & Sluys, 1970). As atividades succinato e malato-desidrogenásicas sofrem pouca alteração. No entanto, nos dois dias subsequentes há um aumento nas referidas atividades oxidásicas e desidrogenásicas.

Eldan & Mayer (1972) estudaram a ativação da citocromo c -redutase durante a germinação de alface. Eles verificaram um rápido aumento na atividade citocromo c-reduzida durante as fases iniciais da germinação de alface. No entanto, o aumento desta atividade não ocorre paralelamente com a absorção de água e com o aumento na atividade citocromo-oxidásica. Para os mesmos autores ficou claro que o desenvolvimento da atividade citocromo c-reduzida não é função simplesmente da absorção de água pelas sementes e que a ativação de enzimas durante as fases iniciais da germinação, notadamente da NADH-citocromo c-reduzida, é reconhecida como fator limitante do consumo de oxigênio. Também em mitocôndrias de eixos embrionários de *Arachis hypogaea* foi encontrado aumento nas atividades succinato-citocromo c-reduzida e NADH-citocromo c-reduzida com o tempo de embebição (Wilson & Bonner, 1971).

Os resultados dos trabalhos de Kollöffel & Sluys (1970) sobre o desenvolvimento mitocondrial em cotilédones de ervilha durante a germinação, sugerem que um aumento na capacidade respiratória mitocondrial nas fases iniciais da germinação deve ser atribuído principalmente a maturação bioquímica das enzimas da cadeia transportadora de elétrons. Esta sugestão foi baseada no fato de que os autores verificaram que a atividade oxidásica e o controle respiratório aumentaram fortemente durante a germinação, enquanto que a atividade desidrogenásica aumentou muito pouco no primeiro dia de germinação. Evidências de



maturação da cadeia respiratória foram também encontradas por Wilson & Bonner (1971) que investigaram o transporte de elétrons em eixos embrionários quiescentes de *Arachis hipogaea*. Mitocôndrias isoladas de eixos embrionários quiescentes e de eixos de sementes com até 16 horas de embebição apresentaram-se deficientes em citocromo c, com baixa velocidade de consumo de oxigênio, com succinato e NADH exógenos e com incapacidade de oxidar malato exógeno. Nessas mitocôndrias, a respiração com succinato e NADH foi consideravelmente estimulada pela adição de citocromo c mas a adição de ADP causou pouca mudança no consumo de oxigênio em qualquer dos 3 substratos testados. Desacopladores como bis(hexafluoracetil) acetona e inibidores da respiração acoplados à fosforilação como a oligomicina não tiveram efeito sobre a atividade respiratória. Após 16 horas de embebição, as mitocôndrias de eixos embrionários de *Arachis hipogaea* apresentaram aumento no conteúdo de citocromo c, metabolizaram ativamente succinato, NADH e malato, com controle da respiração pelo ADP e mostraram valores da relação ADP/O próximos de 2,0 para succinato e NADH e próximos de 3,0 para malato, como ocorre em outros tecidos adultos de plantas (Bonner, 1967; Ikuma & Bonner, 1967; Silva Lima *et al.*, 1974; Almeida Ramos, 1977; Fernandes de Melo, 1978). Com o aumento do tempo de embebição, decresceu o estímulo do consumo de oxigênio pelo citocromo c e registrou-se aumento na inibição pela oligomicina e desacoplamento pelo bis(hexafluoracetil) acetona. Mitocôndrias preparadas em qualquer tempo de embebição foram inibidas pelo KCN. Apesar da deficiência de citocromo c em mitocôndrias de eixos embrionários quiescentes, a evidência da inibição da respiração em sementes secas e nos estágios iniciais da germinação, ocorre através de uma cadeia respiratória citocrômica. Os



resultados do trabalho de Wilson & Bonner (1971) indicam que a cadeia respiratória em eixos embrionários quiescentes sofre maturação bioquímica com o tempo de embebição, o que ficou evidenciado sobremaneira no aumento de concentração de componentes do sistema de transporte de elétrons, como também no aumento da atividade respiratória e da eficiência fosforilante.

Mitocôndrias preparadas de sementes quiescentes de feijão seridô (Denslow & Silva Lima, 1977), parecem apresentar um sistema de transporte de elétrons funcionalmente deficiente como o das mitocôndrias de *Arachis hipogaea* estudadas por Wilson & Bonner (1971). Sementes quiescentes de feijão seridô foram capazes de oxidar succinato e NADH exógenos satisfatoriamente somente quando citocromo c foi adicionado ao meio da reação. Todavia, mesmo na presença de citocromo c, elas não foram capazes de oxidar malato exógeno. Um outro fato consistente com a idéia de que os elementos da cadeia de transporte de elétrons se modificam durante os estágios iniciais da germinação é a transição da respiração cianeto-resistente para a respiração cianeto-sensível, que ocorre em sementes de soja entre a 4a. e 8a. horas de germinação (Yentur & Leopold, 1976).

Além das modificações ao nível das atividades enzimáticas, ocorridas ao longo dos períodos iniciais da germinação, outras modificações foram estudadas, sobretudo as verificadas com a adição de citocromo c. O estímulo do consumo de oxigênio pelo citocromo c foi o primeiro estudado por Hackett *et al.* (1960) em tubérculo de batata. Tal efeito não foi constatado por Wiskich & Bonner (1963) em mitocôndrias de batata dotadas de controle respiratório. Wilson & Bonner (1970) verificaram o efeito estimulador do citocromo c em

preparação de partículas submitocondriais de hipocótilos de *Phaseolus aureus*. Este efeito sugere que a cadeia respiratória das mitocôndrias de tecidos vegetais, sofre alterações ao nível da cadeia citocrômica. As alterações relacionadas com citocromo c, não são as únicas porque um aumento de citocromos a-a<sub>3</sub>, b e c, foi também encontrado em mitocôndrias de cotilédones de amendoim durante a germinação, por Breidenbach *et al.* (1967). Estes autores relacionaram a baixa capacidade oxidativa da fração mitocondrial de cotilédones com pouco tempo de embebição com o baixo conteúdo de citocromos c, talvez em particular, a deficiência de citocromos a-a<sub>3</sub>.

Um outro aspecto pelo qual se interpretam as modificações que ocorrem nas fases iniciais da germinação, diferentes das modificações enzimáticas anteriormente descritas, é o da síntese *de novo* dos constituintes mitocondriais. Howell (1961), admitindo que a quantidade de nitrogênio nas frações mitocondriais de cotilédones de soja era proporcional ao número de mitocôndrias, encontrou um aumento no número de mitocôndrias em torno do 5º dia de germinação. A biogênese de mitocôndrias foi demonstrada por Breidenbach *et al.* (1966, 1967) em cotilédones de *Arachis hipogaea* germinantes, pela determinação de propriedades constitutivas e enzimáticas das mitocôndrias, em função do tempo de germinação. Foi mostrado ainda durante a germinação aumento em conteúdo de citocromos, proteínas e DNA, em fração mitocondrial de cotilédones de *Arachis hipogaea*, purificada por centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.

Em sementes germinantes, durante o período de anaerobiose, já foi demonstrada a acumulação de ácido láctico (Cossins, 1964) e etanol (Cossins & Turner, 1959 ,



1962, 1963) , indicativas da ocorrência de fermentação glicolítica e alcoólica, respectivamente. Nestes dois processos de metabolização da glicose ocorre a formação de quantidades reduzidas e iguais de ATP a partir de ADP , constituindo-se mecanismos de emergência capazes de produzir energia por um curto período de tempo, enquanto as vias metabólicas que utilizam oxigênio não estão operantes.

Kollöffel (1970), estudando em cotilédones de ervilha a atividade da álcool-desidrogenase, uma enzima envolvida na fermentação alcoólica, durante a maturação e germinação da semente, mostrou que a enzima é formada durante o desenvolvimento, sendo reativada pela hidratação durante os primeiros 7 dias de germinação. Alto Q.R. (quociente respiratório) e presença de álcool em sementes embebidas de *Phaseolus mungo* também sugerem a ocorrência da fermentação alcoólica durante a germinação (Morohashi & Shimokoriyama, 1975, a). No entanto, no período inicial de embebição, o consumo de oxigênio foi pouco inibido pelo iodoacetato e NaF, a despeito de serem estas substâncias conhecidas como inibidores da glicólise. Morohashi & Shimokoriyama (1975, a) sugeriram que esta insensibilidade do consumo de oxigênio a inibidores da glicólise deve-se ao fato de que a capacidade glicolítica, nos primeiros estágios de embebição da semente, possa ser maior do que a do sistema ciclo do ácido tricarboxílico (CATC) / cadeia de transporte de elétrons (CTE). O mecanismo foi assim atribuído a diferentes graus de ativação da glicólise e sistema CATC/CTE com a hidratação. Para examinar a validade do mecanismo proposto, Morohashi & Shimokoriyama (1975,b) mediram durante a fase inicial de embebição de sementes germinantes os processos de ativação de enzimas glicolíticas e mitocondriais. Os autores encontraram que a atividade das enzimas mitocondriais (succinato-desidrogenase e



citocromo-oxidase) foram inicialmente muito mais baixas do que as das enzimas glicolíticas examinadas (aldolase, gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase e piruvato-quinase). Estes resultados mostraram que a ativação das enzimas mitocondriais está atrasada quando comparada com as do sistema glicolítico e que a atividade mitocondrial é limitante da velocidade do catabolismo da glicose durante um certo período de embebição. Como as atividades de oxidação do succinato e malato pelas mitocôndrias aumentaram em torno de 4 vezes (entre 20 e 75 minutos de embebição), enquanto as atividades da succinato e malato-desidrogenase aumentaram aproximadamente 2 vezes (Morohashi & Shimokoriyama, 1975, b), foi sugerido que a cadeia respiratória é limitante para a respiração de sementes de *Phaseolus mungo*, nos estágios iniciais da embebição. Solomos *et al.* (1972) sugerem que a respiração nos estágios iniciais da germinação de ervilha não ocorre porque a estrutura mitocondrial não está bem desenvolvida.

Do exposto, pode-se concluir que a energia mobilizada durante o processo germinativo é oriunda da atividade mitocondrial através da *maturação* dos sistemas enzimáticos ou da própria biogênese de constituintes mitocondriais e de outras vias metabólicas extra-mitocondriais.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o desenvolvimento da atividade mitocondrial compreendida como atividades oxidativa e fosforilante durante os estágios iniciais da germinação, estudando o relacionamento entre a absorção de água pela semente e sua atividade mitocondrial, com vistas a uma contribuição ao esclarecimento do grau de comprometimento deste sistema produtor de energia durante o processo de germinação.

A atividade mitocondrial foi estudada em sementes quiescentes e embebidas de feijão seridõ, em eixos embrionários e em cotilédones.

A atividade respiratória das preparações mitocondriais foi investigada quanto à capacidade de oxidação de diferentes substratos, ao controle respiratório pelo ADP, à dependência do citocromo c exógeno na velocidade de oxidação de substratos e ao efeito de inibidores da cadeia respiratória.

A atividade fosforilante foi estudada pelo efeito do ADP sobre a velocidade de oxidação de diferentes substratos e também pelos efeitos de inibidores e desacopladores da fosforilação oxidativa.

## MATERIAL E MÉTODOS

### A. Material

No presente trabalho foram utilizadas sementes de feijão de corda do cultivar seridõ. Este material anteriormente descrito como *Vigna sinensis* (L.) Savi é na realidade *Vigna unguiculata* (L.) Walp. de acordo com Verdcourt (1970). As referidas sementes foram fornecidas pelo Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Foram utilizados os reagentes abaixo relacionados com as respectivas procedências:

E. Merck Ag. Darmstãd: ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido succínico, ditionita de sódio, EDTA;

NBCo. (Nutritional Biochemical Corporation): ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido cólico, ácido L-málico, e ácido oxalacético;

Carlo Erba: ácido L-ascórbico, manitol, L-cisteína;

Sigma Chemical Company: ácido DL- $\beta$ -hidroxibutírico, ácido fumárico, ácido glutâmico, ácido pirúvico, ADP, BSA, FCCP, oligomicina, Triton X-100.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### B. Métodos

#### Condições de embebição e germinação

Após a seleção, as sementes foram esterilizadas por imersão durante 5 minutos, em solução de hipoclo-



rito de sódio, contendo 5,2% de cloro ativo. Em seguida, as sementes foram lavadas em excesso de água corrente e água destilada e semeadas em papel de filtro ou em vermiculita.

A semeadura em papel de filtro, foi feita colocando-se as sementes entre duas folhas de papel ( $80\text{g/m}^2$ ) de 30cm x 30 cm, previamente esterilizadas em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos e umedecidas com água destilada. Dez sementes foram dispostas em fila horizontal a aproximadamente 2,5cm da borda superior das folhas de papel, que após a semeadura foram dobradas, formando rolos. Cada conjunto de 5 rolos foi colocado verticalmente em depósitos plásticos com capacidade de 500 ml, contendo 20 ml de água destilada. Estes depósitos foram colocados em cubas de plástico, mantidas na obscuridade. A temperatura no interior das cubas, durante o período de embebição, foi de aproximadamente  $26^\circ\text{C}$ . Os tempos de embebição variaram de 24 a 88 horas, quando as mitocôndrias foram isoladas de eixos embrionários. Para a obtenção de mitocôndrias de cotilédones, as sementes foram embebidas durante os períodos de 18, 24, 38 e 48 horas.

Para a germinação em vermiculita, as sementes foram semeadas na superfície da mistura de vermiculita e água na proporção de 3:1 (v:v), em recipiente plástico. A germinação foi feita à temperatura de aproximadamente  $26^\circ\text{C}$ , na obscuridade durante 6 dias.

#### Determinação do aumento do peso fresco

Inicialmente, 5 amostras de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridô foram embebidas nas mesmas condições

anteriormente descritas para semeadura em papel de filtro, durante os períodos de 1, 5, 10, 20, 24, 30, 40, 48 e 72 horas. Após a embebição foi feita a remoção do excesso de água da superfície das sementes, colocando-as entre duas folhas de papel de filtro.

O peso fresco foi determinado pela média aritmética dos pesos das cinco amostras de sementes embebidas. Os valores de peso fresco foram expressos em mg x semente<sup>-1</sup>. O aumento no peso fresco foi calculado pela diferença entre o peso fresco da semente embebida e o peso fresco da semente quiescente.

#### Preparação mitocondrial

Para o isolamento da fração mitocondrial foram utilizados sementes quiescentes, cotilédones e eixos embrionários quiescentes, cotilédones e eixos embrionários de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição e hipocótilos de plântulas colhidas após 6 dias de semeadura em vermiculita. Todas as etapas referentes ao isolamento da fração mitocondrial foram desenvolvidas em câmara fria, à temperatura de 6 ° C, usando-se material e meios previamente resfriados. No preparo do homogenato à exceção dos hipocótilos, houve modificação no procedimento de separação, de acordo com o tipo de material usado. Assim:

1) As mitocôndrias de hipocótilos foram isoladas utilizando-se a técnica de Ikuma (Ikuma, 1970), modificada por Silva Lima (Silva Lima, 1977).

2) As sementes e cotilédones quiescentes foram trituradas em moinho Wiley adaptado com uma tela de 60 malhas por polegada linear (60 *mesh*). A farinha



resultante foi macerada em gral de porcelana com meio de homogeneização, na proporção de 1:2 (p:v), utilizando areia de quartzo (Nawa & Asahi, 1971) na proporção de 2:1 (p:p);

3) Os eixos embrionários de sementes quiescentes e submetidas a diferentes tempos de embebição foram separados dos cotilédones com a ajuda de estilete. Eixos embrionários de sementes embebidas, foram lavados duas vezes com água destilada e uma vez com meio de homogeneização. Os eixos embrionários foram macerados em gral de porcelana com meio de homogeneização na proporção de 1:2 (p:v). Na maceração, areia de quartzo foi adicionada na proporção de 2:1 (p:p), somente aos eixos embrionários de sementes quiescentes.

4) Cotilédones de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição, foram obtidos após remoção do tegumento das sementes embebidas e extração dos eixos embrionários, com a ajuda de estilete. Os cotilédones isolados, foram lavados duas vezes com água destilada e uma vez com meio de homogeneização. A maceração foi feita com gral com meio de homogeneização na proporção 1:2 (p:v).

O meio de homogeneização teve a seguinte composição: manitol 0,3M, EDTA 1mM, BSA 0,1% (p:v), fosfato de potássio 2,5 mM e cisteína 0,5% (p:v), com pH final 7,4.

As etapas seguintes da preparação mitocondrial foram as mesmas independentes do tipo de material. O homogenato resultante da maceração foi filtrado em tela de *nylon* (malhas de 50 $\mu$ ), ajustado para pH em torno de 7 com KOH 6N e posteriormente submetido a centrifugação diferencial em centrífuga Sorvall RC-5 a 4°C, segundo o



esquema exposto no diagrama 01. O homogenato foi inicialmente centrifugado a 400xg durante 10 minutos, possibilitando a separação de amido, núcleos e restos celulares no precipitado. O sobrenadante, contendo a fração mitocondrial, foi centrifugado a 10.000xg por 20 minutos, resultando a separação das mitocôndrias no precipitado. O precipitado mitocondrial foi suspenso em meio de lavagem com a seguinte composição: manitol 0,3M, BSA 0,1% (p:v), fosfato de potássio 2,5mM, com pH final 7,2. A suspensão mitocondrial resultante foi suavemente homogeneizada em homogeneizador Potter-Elvehjem e em seguida centrifugada a 400 x g por 10 minutos, com a finalidade de purificar a fração mitocondrial. O sobrenadante contendo a fração mitocondrial foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos. O precipitado mitocondrial resultante foi ressuspenso em 0,5 a 1,5 ml de meio de lavagem mantido em banho de gelo ao longo da experiência.

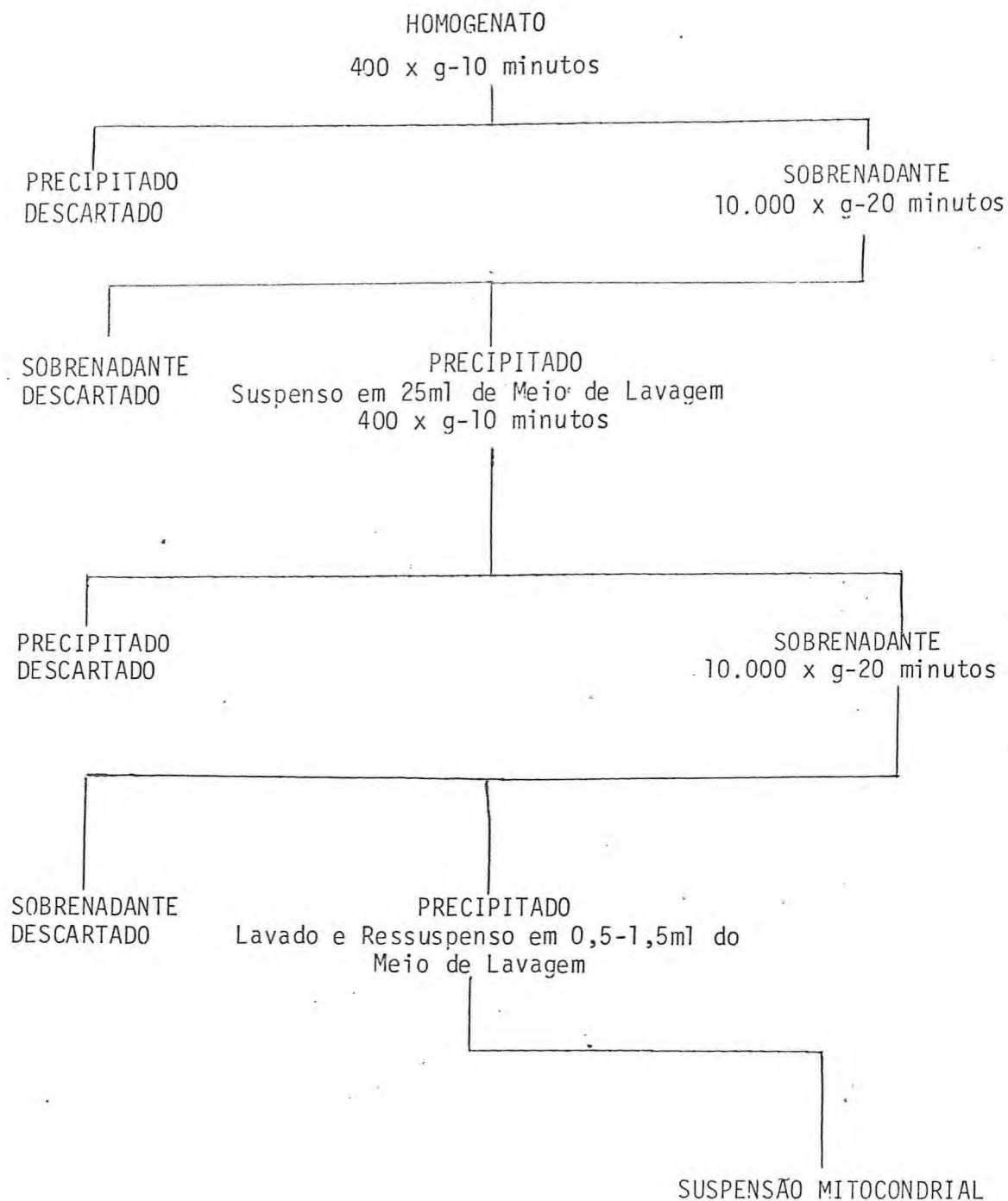


DIAGRAMA 01. Esquema de Centrifugação Diferencial para o Isolamento de Mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.)Walp. cv.seridõ.

### Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas na fração mitocondrial ou nas trações do gradiente linear de densidade de sacarose foi determinada pelo método do biureto modificado por Gornall (Gornall *et al.*, 1949). A modificação consistiu na adição de colato de sódio com a finalidade de solubilizar as proteínas membranares. O meio de reação consistia de colato de sódio 0,26%, preparação mitocondrial ou fração do gradiente linear de densidade de sacarose, hidróxido de sódio 8% e sulfato de cobre 0,1%, adicionados na ordem indicada. Após 15 minutos de repouso, para desenvolvimento da reação corada característica, foi feita a medida da absorbância a 540nm em um fotocolorímetro Spekol aus Jena. A leitura de absorbância da amostra foi feita contra uma prova em branco dos reagentes mencionados, à exceção da preparação.

A concentração de proteína foi determinada em relação a uma curva padrão de BSA, na qual 1 mg de proteína apresentava absorbância de 0,081, a 540nm.

### Purificação em gradiente linear de densidade de sacarose

O gradiente linear de densidade de sacarose, foi preparado segundo Parish (Parish, 1972). No diagrama 02, o reservatório (A) e a câmara de mistura (B) foram preparados com seringas de 10ml. A conexão entre ambos foi feita com tubo de *tygon*. Na câmara de mistura (B) foi feito um orifício, onde foi introduzida uma agulha com um tubo na extremidade externa, através do qual era recolhido o gradiente no tubo de centrífuga (C). A mistura do conteúdo da câmara B foi feita por intermédio de uma haste movimentada por um motor com velocidade controlada. A



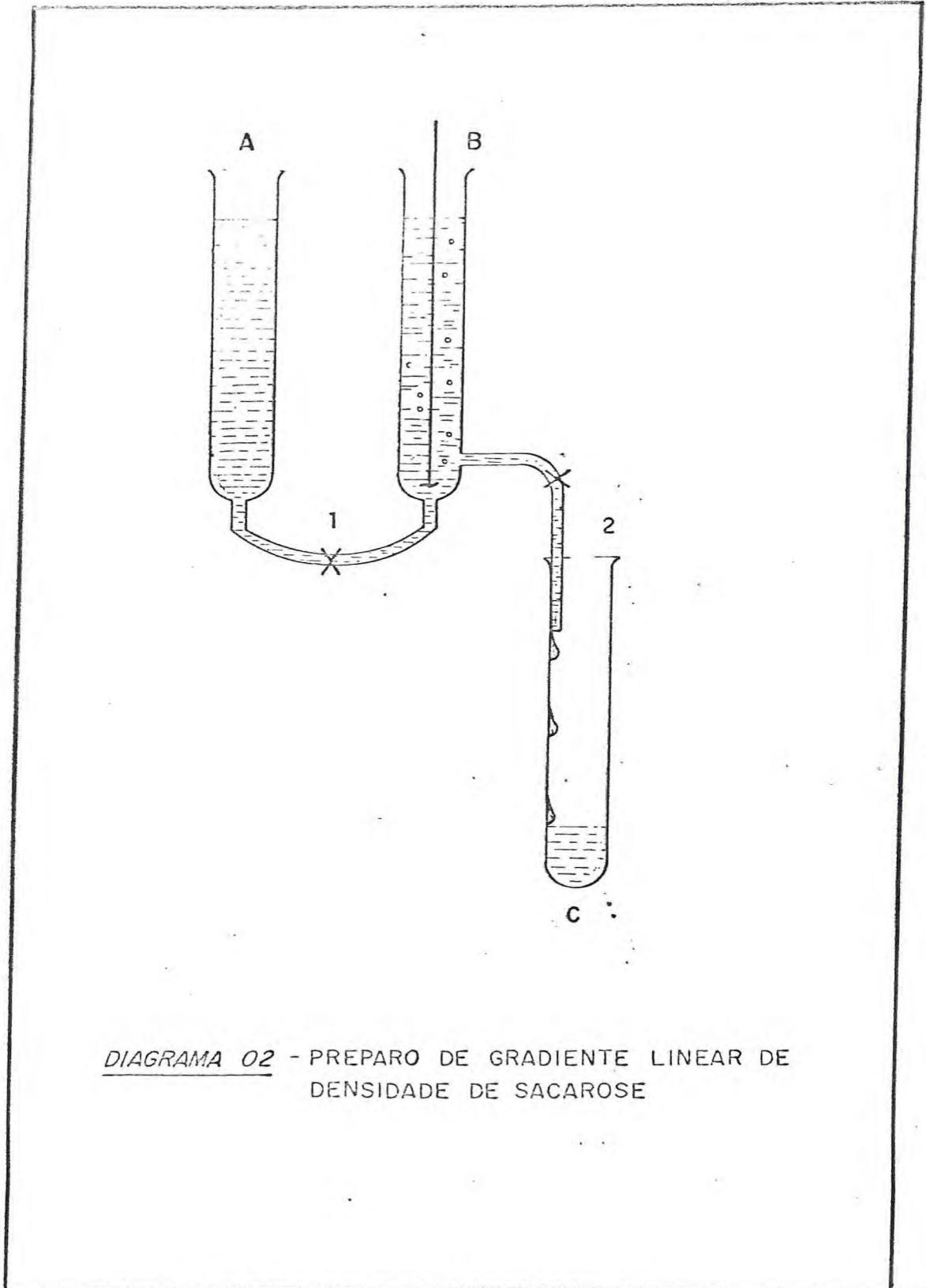


DIAGRAMA 02 - PREPARO DE GRADIENTE LINEAR DE DENSIDADE DE SACAROSE

solução de sacarose 65% foi colocada em B e a solução de sacarose 35% em A. Ambas as soluções continham tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,2 e EDTA 1mM. Uma vez abertas as conexões 1 e 2, o gradiente foi coletado em tubo de ultracentrífuga (C) e equilibrado durante 1 hora a 4°C, antes da adição da amostra.

A fração mitocondrial foi preparada de sementes quiescentes, conforme descrito anteriormente, sendo o precipitado mitocondrial final ressuspensado em solução de sacarose 35%. Uma amostra de 0,5ml da suspensão mitocondrial foi cuidadosamente colocada sobre 9ml de gradiente linear de densidade de sacarose (35-65%, p/v).

A centrifugação do gradiente foi feita a 86.200 x g, em ultracentrífuga refrigerada IEC (International Equipment Company - Modelo HR.1, rotor SB 283), durante 3 horas, à temperatura de 4° C. Após a centrifugação, introduziu-se dentro do tubo de ultracentrífuga uma agulha conectada a uma bomba peristáltica através de tubo plástico, por onde foram recolhidas alíquotas de 0,25ml, iniciando a separação a partir da fração mais pesada para a mais leve.

#### Espectro diferencial de cadeia citocrômica

Os espectros de cadeia citocrômica das frações mitocondriais isoladas de eixos embrionários de sementes quiescentes, e de hipocótilos de plântulas colhidas após 6 dias de semeadura, foram feitos em um espectrofotômetro de duplo feixe *Carry 15*. A espectroscopia foi feita à temperatura de 77°K.

À temperatura ambiente, a estrutura dos citocromos oscila entre várias formas moleculares próximas. Isto permite absorção da luz com variações de comprimento de onda muito pequenas, causando um alargamento global da faixa de absorção e conseqüentemente, uma má resolução dos diferentes componentes dos espectros. Baixas temperaturas apresentam a vantagem de *fixar* a estrutura dos citocromos. Então, com o abaixamento da temperatura para 77°K, obtem-se faixas de absorção mais estreitas e conseqüentemente, melhor resolução dos espectros.

Na obtenção dos espectros da cadeia citocrômica, optou-se pela determinação do espectro diferencial, isto é, a relação Espectro reduzido/Espectro oxidado (Chance, 1965), eliminando-se desta forma, a parte da luz absorvida pelas proteínas que não pertencem à cadeia respiratória.

Na determinação do espectro diferencial, a prova em branco consistiu de uma mistura de suspensão mitocondrial e  $H_2O_2$  1mM. O peróxido de hidrogênio possibilitou a oxidação da fração mitocondrial. A redução das preparações mitocondriais, em diferentes graus, foi feita com traços de ditionita, ascorbato 2mM ou succinato 10mM. A determinação do espectro diferencial foi feita através da leitura de absorção óptica das formas reduzidas, contra a prova em branco. A leitura de absorção óptica foi feita em caminho óptico de 3mm, em volume final de 1,5 ml com meio fosforilante. A composição do meio fosforilante foi manitol 0,3M, tampão fosfato de potássio 10mM, pH 7,2, KCl 10mM e  $MgCl_2$  6mM.



Atividade da citocromo-oxidase (Appelmans *et al.* 1955)

Princípio:

A atividade citocromo-oxidásica foi determinada espectrofotometricamente em 550 nm, seguindo-se o desaparecimento do citocromo c reduzido (banda  $\alpha$ ) pelo decréscimo na absorbância.

Procedimento:

A reação enzimática foi realizada pela adição, no tempo zero, de uma alíquota de 10  $\mu$ l da fração do gradiente linear de densidade previamente lisada com Triton-X-100 0,004%, a 1 ml de solução de citocromo c reduzido (solução de citocromo c 41  $\mu$ M em EDTA 1mM e tampão fosfato 0,03M, pH 7,4; reduzida 90% pela adição de traços de ditionita de sódio). A prova em branco do ensaio consistiu de 1 ml da solução de citocromo c, completamente reoxidada por uma pequena quantidade de ferricianeto de potássio. O decréscimo da absorbância foi medido, contra a prova em branco, durante 3 minutos, em intervalos de 25 segundos, a 550 nm, em espectrofotômetro Beckman DU, à temperatura de 25°C.

Definição da atividade:

A atividade da citocromo-oxidase é definida por uma constante de velocidade de reação de primeira ordem:

$$k = 2,3 \log \frac{\text{absorbância no tempo zero}}{\text{absorbância no tempo de 1 min.}}$$

A atividade específica é calculada a partir de concentrações conhecidas de citocromo c no meio de reação, e a constante de velocidade é calculada segundo a equação precedente.

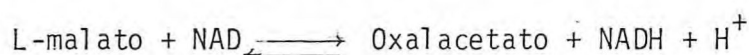
$$\text{Atividade específica} = k \times \frac{\text{concentração de citocromo c}}{\text{concentração de proteínas}}$$

Para o cálculo das concentrações de citocromo c utiliza-se o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) do citocromo c oxidado a 550 nm, cujo valor é  $18,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

Atividade da malato-desidrogenase (Ochoa, S. 1955).

Princípio:

A malato-desidrogenase catalisa a reação:



A atividade malato-desidrogenásica foi determinada espectrofotometricamente, seguindo-se a transformação de oxalacetato em malato, pelo decréscimo na absorbância a 340nm, devido à oxidação do NADH.

Procedimento:

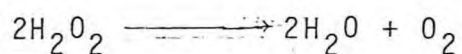
A reação enzimática foi desenvolvida pela adição, no tempo zero, de uma alíquota da fração do gradiente linear de densidade de sacarose, lisada com Triton-X-100 0,004% a um meio contendo NADH 0,12mM, oxalacetato 0,6M e meio de reação no volume final de 1ml. O meio de reação teve a seguinte composição: manitol 0,3M tampão fosfato de potássio 10mM, pH 7,2 KCl 10mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM e BSA 0,1%. A prova em branco do ensaio, foi 1ml do meio de reação. O decréscimo na absorbância foi medida, contra a prova em branco, durante 3 minutos, em intervalos de 25 segundos, a 340nm em espectrofotômetro Beckman DU, à temperatura de 25° C.

Definição de Atividade:

Uma unidade da enzima é definida como aquela quantidade de enzima que causa um decréscimo de 0,001 na absorvância do NADH, a 340nm, em 1 minuto.

Atividade da catalase (Luck, H., 1965)Princípio:

A catalase catalisa a reação:



A atividade catalásica foi determinada espectrofotometricamente, seguindo-se a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo decréscimo na absorvância, a 240nm.

Procedimento:

A reação enzimática foi realizada pela adição, no tempo zero, de uma alíquota da fração do gradiente linear de densidade de sacarose, lisada com Triton-X-100 0,004% a uma solução  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,013M e tampão fosfato de potássio 0,067M a pH 7,0, no volume final de 3ml. A prova em branco consistia dos mesmos reagentes sem a fração do gradiente. O decréscimo na absorvância foi medido durante 3 minutos, em intervalos de 25 segundos, a 240nm, em espectrofotômetro Beckman DU, à temperatura de 25 °C.

Definição de Atividade:

Uma unidade da enzima é definida como aquela quantidade da enzima que cinde a metade do peróxido de hidrogênio da solução, em 100 segundos, a 25 °C.



### Atividades oxidativa e fosforilante

A atividade oxidativa de mitocôndrias foi medida pela determinação polarográfica do consumo de oxigênio em oxígrafo Gilson, Modelo K-IC, polarizado a 0,8v; com eletrodo de Clark acoplado à câmara de reação, à temperatura de 26°C. A sequência padrão de adições à câmara de reação, resultando no volume final de 1,5ml, foi a seguinte: 1,4ml de meio fosforilante, pH 7,2 (manitol 0,3M, tampão fosfato de potássio 10mM, pH 7,2 KCl 10mM e MgCl<sub>2</sub> 6mM) e fração mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de substrato oxidável. A ordem e a concentração das adições subsequentes, estão indicadas nas legendas das figuras correspondentes.

A concentração de ADP foi determinada espectrofotometricamente, tendo como base o seu coeficiente de extinção milimolar de 15,4mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a 260nm (Ikuma, 1970).

### Cálculo do consumo de oxigênio

Para o cálculo do consumo de oxigênio, foi previamente determinada a concentração de 222 µM de oxigênio dissolvido no meio fosforilante, basicamente constituído de manitol 0,3M. Com este dado, calculou-se que ocorre 333 nanomoles de oxigênio/1,5ml, ou seja, 666 nanoátomos de oxigênio/1,5ml do mesmo meio. Em seguida, foi calculado que, no papel do registro polarográfico com a altura de 185mm, 1 milímetro corresponde a 1,8 nanomoles de oxigênio, ou 3,6 nanoátomos de oxigênio/1,5ml. Durante a reação, a velocidade de deslocamento do papel foi fixada em 12mm x min<sup>-1</sup>. Então, a velocidade de consumo de oxigênio foi calculada, a partir da seguinte expressão:

$$V = c \times h \times t^{-1}, \text{ onde:}$$

V = velocidade de consumo de oxigênio em nanomoles  $\times \text{min}^{-1} \times 1,5\text{ml}^{-1}$ ;

C = constante indicativa de que a altura de 1mm, percorrida no papel, corresponde ao consumo de oxigênio de 1,8 nanomoles/1,5ml;

h = altura em mm percorrida no papel;

t = 1 minuto.

### Cálculo de controle respiratório

O controle respiratório (C.R.) foi calculado segundo Chance & Williams (1956), conforme a expressão abaixo:

$$\text{C.R.} = V_3/V_4, \text{ onde:}$$

$V_3$  = consumo de oxigênio no estado 3, em presença de substrato e ADP;

$V_4$  = consumo de oxigênio no estado 4, em presença de substrato.

Na determinação desta relação foram sempre considerados os valores do primeiro estado 3 e o segundo estado 4.

Cálculo da relação ADP/O

A relação ADP/O foi calculada de acordo com Chance & Williams (1956), e Hagihara (1961), através da seguinte expressão:

$$ADP/O = ADP/h \times C, \text{ onde:}$$

ADP = nanomoles de ADP adicionados ao meio fosforilante;

h = altura em milímetros, percorrida no papel, durante o estado 3;

C = constante indicativa de que a altura de 1 mm corresponde ao consumo de oxigênio de 3,6 nanoátomos.



## RESULTADOS

### Caracterização funcional da fração mitocondrial isolada de sementes e eixos embrionários quiescentes.

Para a caracterização funcional de mitocôndrias de sementes e eixos embrionários quiescentes, foi realizado o estudo da capacidade funcional no que diz respeito a atividade oxidativa e fosforilante.

Inicialmente foi feito o estudo da utilização de substratos oxidáveis do ciclo do ácido tricarboxílico e de outras rotas metabólicas. A Tabela I mostra que a fração mitocondrial de sementes quiescentes é capaz de oxidar succinato, NADH exógeno satisfatoriamente, somente quando citocromo c é adicionado ao meio da reação. Todavia mesmo na presença de citocromo c, ela é incapaz de oxidar L-malato, citrato, piruvato, DL- $\beta$ -hidroxibutirato, L-glutamato e fumarato. Na presença de citocromo c foram registrados baixos valores de consumo de oxigênio para  $\alpha$ -cetoglutarato e isocitrato (Tabela I), sendo que no caso do isocitrato isso pode ser devido à falta de precisão na medida, não refletindo conseqüentemente, uma atividade oxidativa. Em mitocôndrias de sementes quiescentes, não foi determinada nenhuma atividade fosforilante, durante oxidação do succinato, com a adição de ADP na ausência e presença de citocromo c (Fig. 02 (A) e (B), respectivamente). O aumento do consumo de oxigênio após a adição de ADP, que seria indicativo do estado de acoplamento, não se verificou durante a oxidação do succinato (Fig. 02(B)). A figura 02 (A), mostra que a oligomicina, inibidor da respiração acoplada à fosforilação, também não teve influência inibitória da respiração em presença de ADP. A mesma figura mostra a inibição total da cadeia de transporte de elétrons pelo KCN, inibidor da citocromo-oxidase.

Os traçados polarográficos da figura 03 mostram a atividade oxidativa de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes. Estas mitocôndrias como as isoladas de sementes quiescentes oxidam fracamente os substratos succinato e NADH (Fig. 03 (A) e (B) respectivamente), e são incapazes de oxidar o L-malato (Fig. 03 (C)). A adição de ADP como uma tentativa de caracterizar uma atividade fosforilante não teve efeito sobre a velocidade de oxidação dos substratos succinato, NADH e L-malato (Fig. 03) sugerindo ausência de atividade fosforilante ou fraca atividade fora dos limites mensurados. No estudo da capacidade oxidativa de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes, foi testado o efeito do KCN inibidor da citocromo-oxidase. A figura 03 mostra que o KCN inibiu completamente a atividade oxidativa destas mitocôndrias em presença de succinato, NADH e L-malato.

A figura 04 mostra o efeito do citocromo c na oxidação dos substratos succinato, NADH e L-malato. Com succinato e NADH houve aumento no consumo de oxigênio após a adição de citocromo c, o qual não alterou a velocidade de oxidação do L-malato. Ainda na presença de citocromo c, a atividade respiratória do succinato, NADH e L-malato, não foi estimulada pelo ADP.

TABELA I - Consumo de oxigênio medido polarograficamente de mitocôndrias de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. seridô em presença de diferentes substratos e ausência e presença de citocromo 2,13  $\mu$ M. A técnica de isolamento e o meio fosforilante estão descritos em MATERIAL E MÉTODOS. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 2,5mg. O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente com eletrodo de Clark, a 26 °C, em volume de 1,5ml; expresso em nanomoles de  $O_2 \text{min}^{-1}$  por 1,5ml.

Substrato	Consumo de oxigênio (nanomoles de $O_2 \text{min}^{-1}$ por 1,5ml)	
	-cit c	+cit c
Succinato 13mM	9,0	27,0
NADH 1mM	18,0	61,0
L-malato 33mM	-	0,0
Citrato 10mM	-	0,0
Isocitrato 20mM	-	4,0
$\alpha$ -cetogluturato 13mM	-	9,0
Piruvato 13mM	-	0,0
DL- $\beta$ -hidroxibutirato 23mM	-	0,0
L-glutamato 20mM	-	0,0
Fumarato 66mM	-	0,0



MT. 4 4 4  
SUCC. → ADP → Olig. → A

MT. 4  
SUCC. → Cit. c → 20  
ADP → 20  
FCCP → 11  
KCN → B

50  $\mu$ M O<sub>2</sub>  
1 min

FIGURA 02: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, em ausência e presença de citocromo c 2,13  $\mu\text{M}$ , tendo succinato 13mM como substrato mostrando os efeitos do ADP 3,68  $\mu\text{M}$ , oligomicina 3  $\mu\text{g/ml}$ , FCCP 6,6  $\mu\text{M}$  e KCN 3  $\mu\text{M}$  na atividade oxidativa. A reação foi desencadeada pela adição do substrato ao meio fosforilante contendo 1,8mg de proteína da fração mitocondrial, seguida por adições conforme indicações das setas, em volume final de 1,5ml. Os números ao longo dos traçados expressam o valor do consumo de oxigênio em nanomoles de  $\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$  por 1,5ml. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e na legenda da Tabela I.

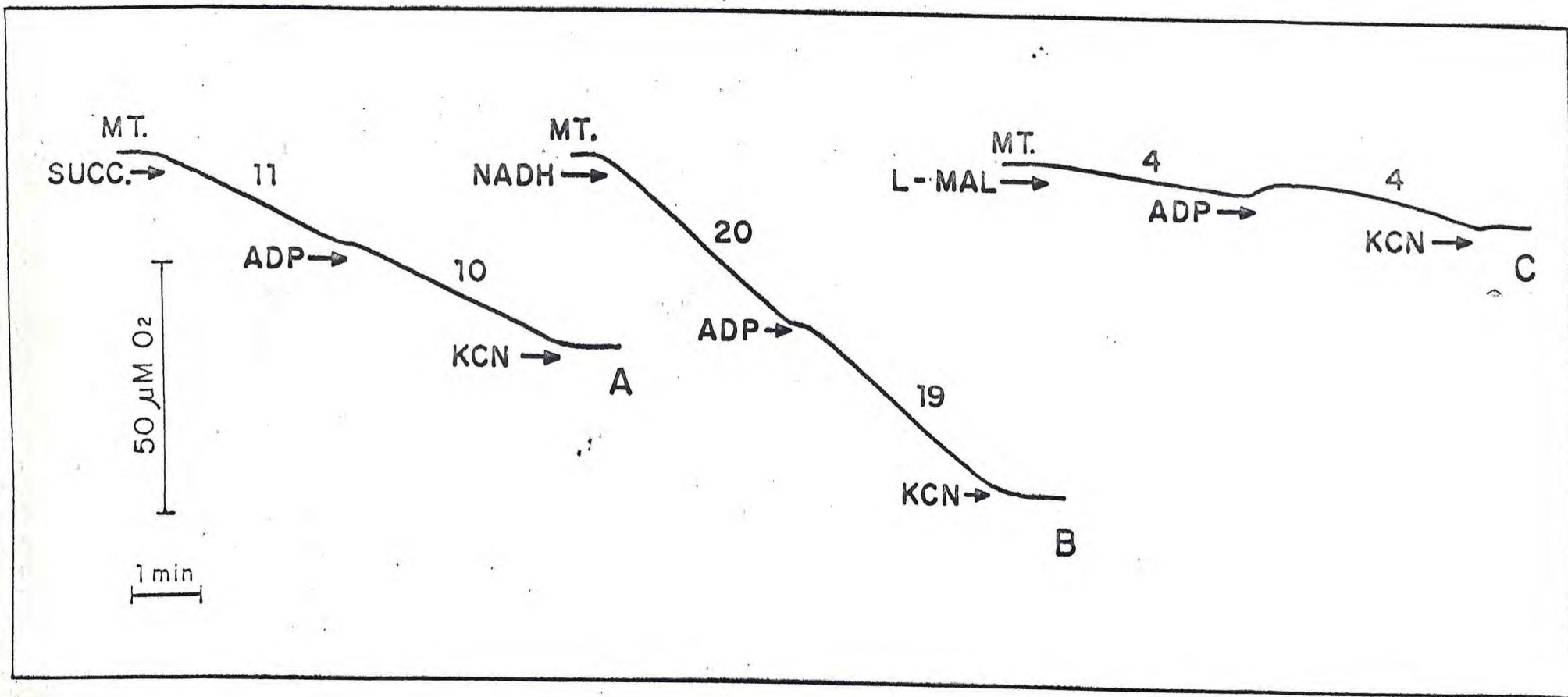




FIGURA 03: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, em presença de: (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato, 33mM mostrando o efeito do ADP 186 $\mu$ M e KCN 20 $\mu$ M na atividade oxidativa. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

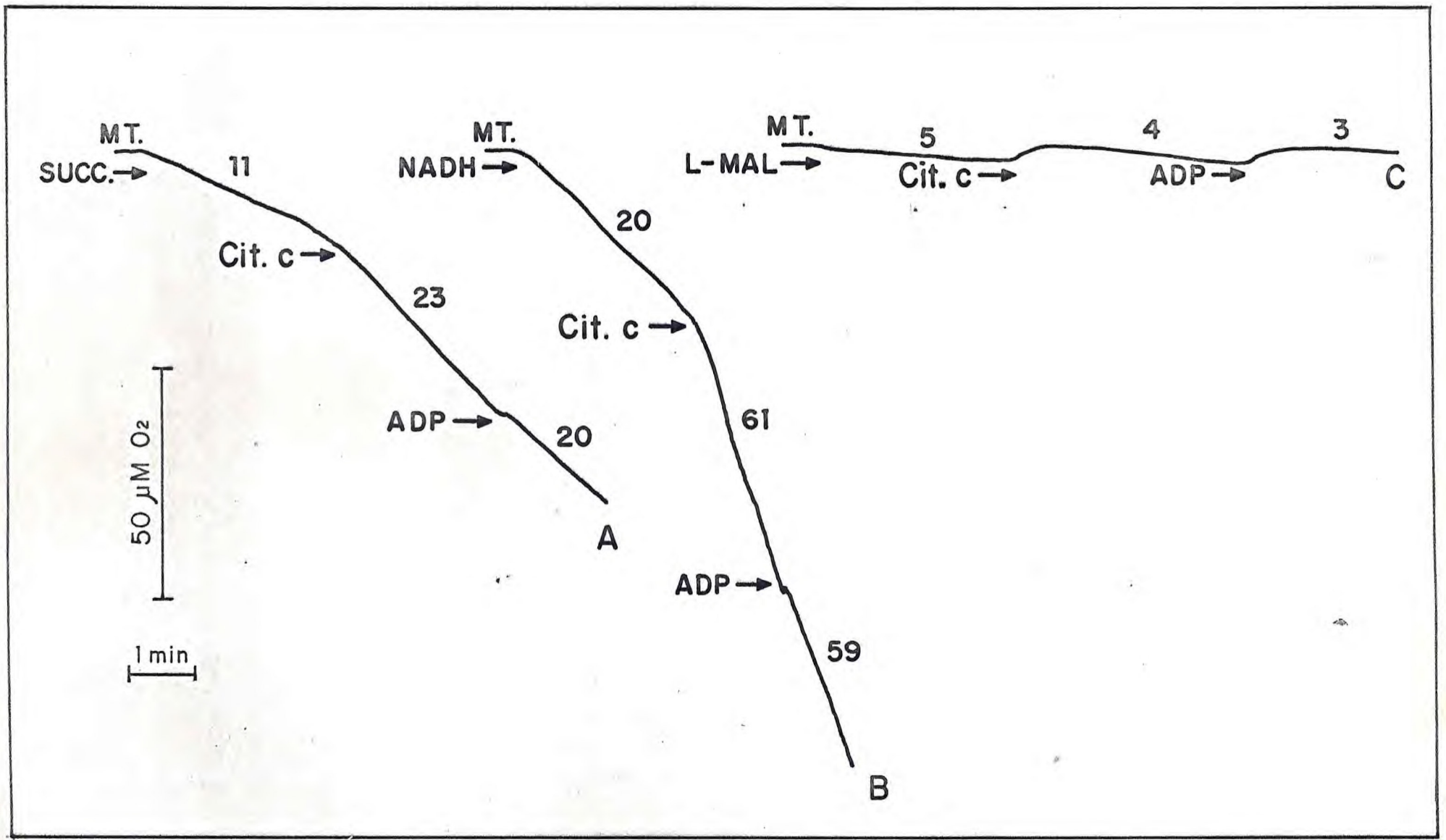


FIGURA 04: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. seridô em presença de citocromo c  $2,13 \mu\text{M}$ , em presença de (A) succinato  $16\text{mM}$ , (B) NADH  $1\text{mM}$  e (C) L-malato  $33\text{mM}$ , mostrando o efeito do ADP  $186 \mu\text{M}$  na atividade oxidativa. A quantidade de proteína mitocondrial foi de  $1,6\text{mg}$ . As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.



### Absorção de água pelas sementes

A determinação da quantidade de água absorvida pelas sementes foi feita com o objetivo de situar a atividade de mitocôndrias de eixos embrionários e cotilédones de sementes embebidas, dentro do quadro geral de germinação de sementes.

A figura 05 mostra que o peso fresco das sementes aumentou durante as primeiras 24 horas de embebição ; estabilizou e apresentou um novo aumento a partir de 30 horas de embebição. A emergência da radícula ocorreu após 30 horas de embebição.

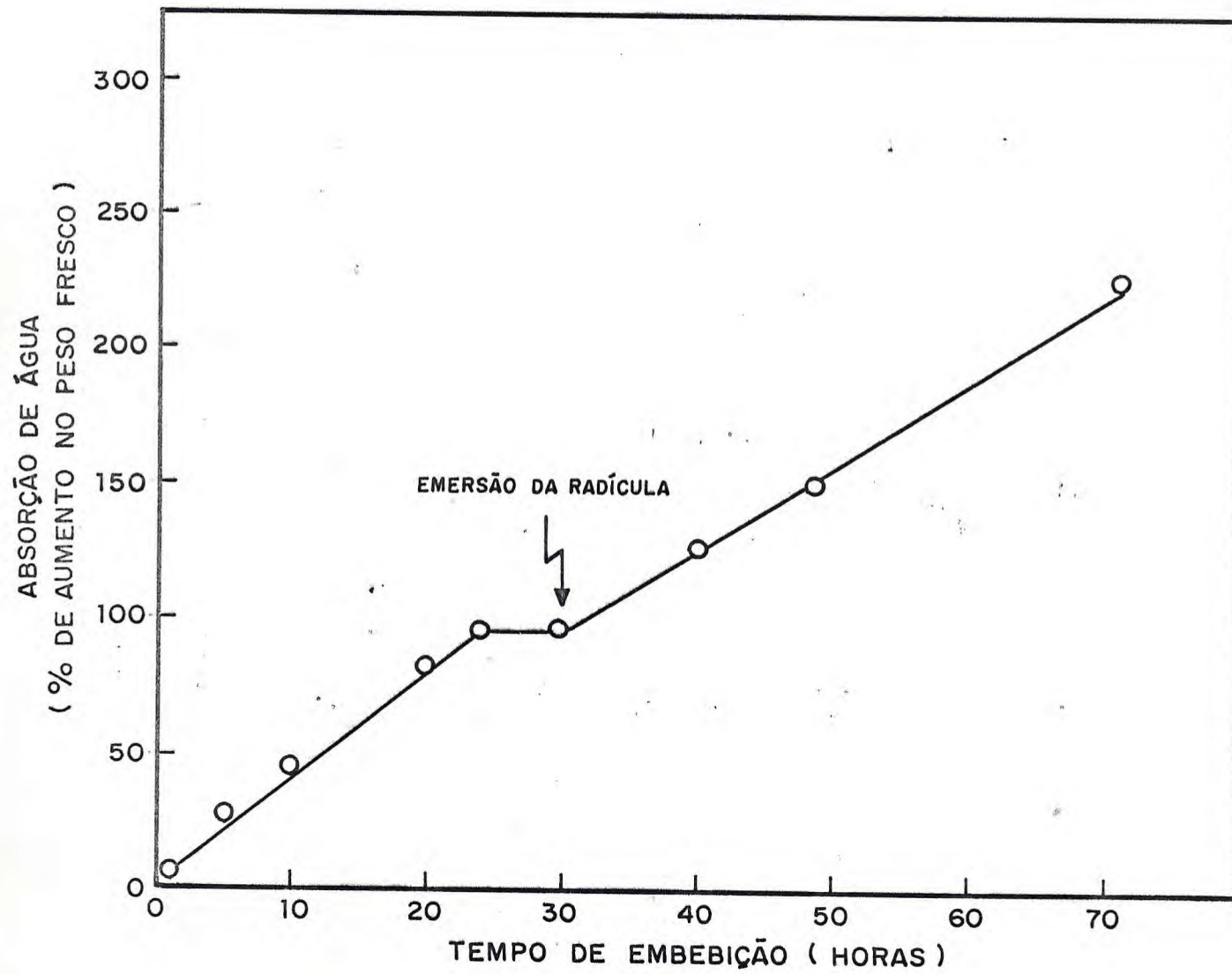


FIGURA 05: Curva de variação de peso fresco de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, submetidas a diferentes tempos de embebição em água. As condições de embebição estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.



Caracterização funcional de fração mitocondrial isolada de eixos embrionários de sementes embebidas

Atividade oxidativa

A figura 06 mostra a atividade oxidativa de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes embebidas, medida polarograficamente durante diversos períodos de tempo, em presença dos substratos: succinato, NADH e L-malato. A velocidade de oxidação destes substratos manteve-se constante nas primeiras 60 horas de embebição, com valores comparáveis aos da velocidade de oxidação em mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes. A seguir, a velocidade de consumo de oxigênio aumentou significativamente e atingiu um *plateau* com 64 horas de embebição. A atividade oxidativa foi mais alta com NADH do que com succinato, por sua vez, mais elevada do que com L-malato.

O efeito do KCN foi testado sobre a atividade oxidativa de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes com 64 horas de embebição. Nestas mitocôndrias, a atividade respiratória devida à oxidação dos substratos (A) succinato, (B) NADH e (C) L-malato, foi completamente inibida pelo KCN, como mostram os traçados polarográficos da figura 07.

A atividade oxidativa em mitocôndrias de eixos embrionários de sementes embebidas na presença de citocromo c (Fig. 08) aumentou consideravelmente nas primeiras 48 horas de embebição, com NADH e succinato, decrescendo em seguida. Também na presença de citocromo c, o consumo de oxigênio foi mais alto com NADH do que com succinato. Com L-malato o consumo de oxigênio, na presença de citocromo c (Fig. 08), foi comparável à atividade oxidativa determinada na ausência de citocromo c (Fig. 06). O cito-

citocromo c portanto, não teve efeito estimulador do consumo de oxigênio com L-malato.

As figuras 09 e 10 mostram as curvas da diferença do consumo de oxigênio em presença e ausência de citocromo c (respiração citocromo c dependente) tendo succinato e NADH, respectivamente, como substratos oxidáveis. Observa-se que, enquanto a tendência do consumo de oxigênio dependente de citocromo c em mitocôndrias de eixos embrionários decresce após 48 horas de embebição da semente, a tendência do consumo de oxigênio em ausência de citocromo c aumenta após 60 horas de embebição para atingir um máximo com 64 horas (Fig. 06).

#### Atividade fosforilante

Os efeitos do tempo de embebição e do citocromo c exógeno nas relações de C.R. e ADP/O são mostrados nas Tabelas II, III e IV, com os substratos succinato, NADH e L-malato, respectivamente. Verificou-se que mitocôndrias de eixos embrionários de sementes com até 60 horas de embebição, oxidando succinato, NADH e L-malato, na presença ou não de citocromo c, não apresentaram fosforilação oxidativa, como indicado pelas relações C.R. e ADP/O. Observou-se ainda que, com os mesmos substratos, na ausência e presença de citocromo c exógeno, somente a partir de 64 horas de embebição houve fosforilação oxidativa, com valores das relações de C.R. e ADP/O próximos aos valores teóricos encontrados para aqueles substratos em mitocôndrias de tecido vegetal adulto, parecendo aumentar levemente com o tempo de embebição.

Os traçados polarográficos da figura 11 mostram que o efeito do desacoplador FCCP com os substratos (A) succinato, (B) NADH e (C) L-malato, na presença de ADP,



em mitocôndrias preparadas de eixos embrionários de sementes com 55 horas de embebição, ainda não se manifestou. Contudo, em mitocôndrias de eixos embrionários de sementes com 64 horas de embebição (Fig. 12) na presença dos substratos (A) succinato, (B) NADH e (C) L-malato, começou a ser observada nítida capacidade fosforilante e estímulo na velocidade de consumo de oxigênio pelo FCCP.

Para completar a caracterização da respiração mitocondrial acoplada, foi também testado o efeito da oligomicina em mitocôndrias de eixos embrionários de sementes com 64 horas de embebição (Fig. 13). Verificou-se que, após a adição de oligomicina, não houve estímulo do consumo de oxigênio pelo ADP durante a oxidação dos substratos (A) succinato, (B) NADH e (C) L-malato e como é de esperar o FCCP, ao promover um desacoplamento, conseguiu aumentar a oxidação dos 3 substratos, após a adição da oligomicina.



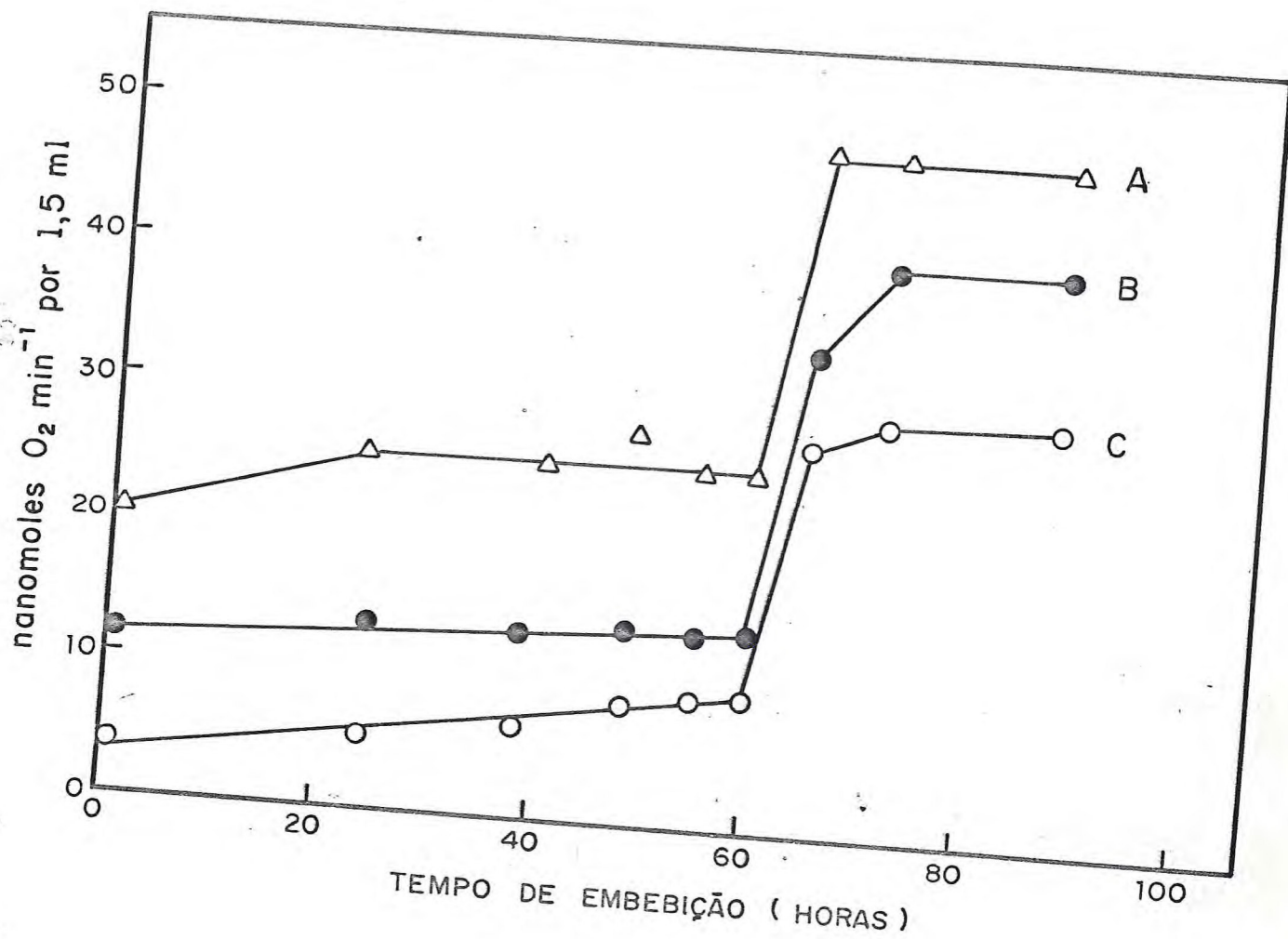


FIGURA 06: Consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a diferentes tempos de embebição em água; na oxidação de (A) NADH 1mM, (B) succinato 16mM e (C) L-malato 33mM, na ausência de citocromo c. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

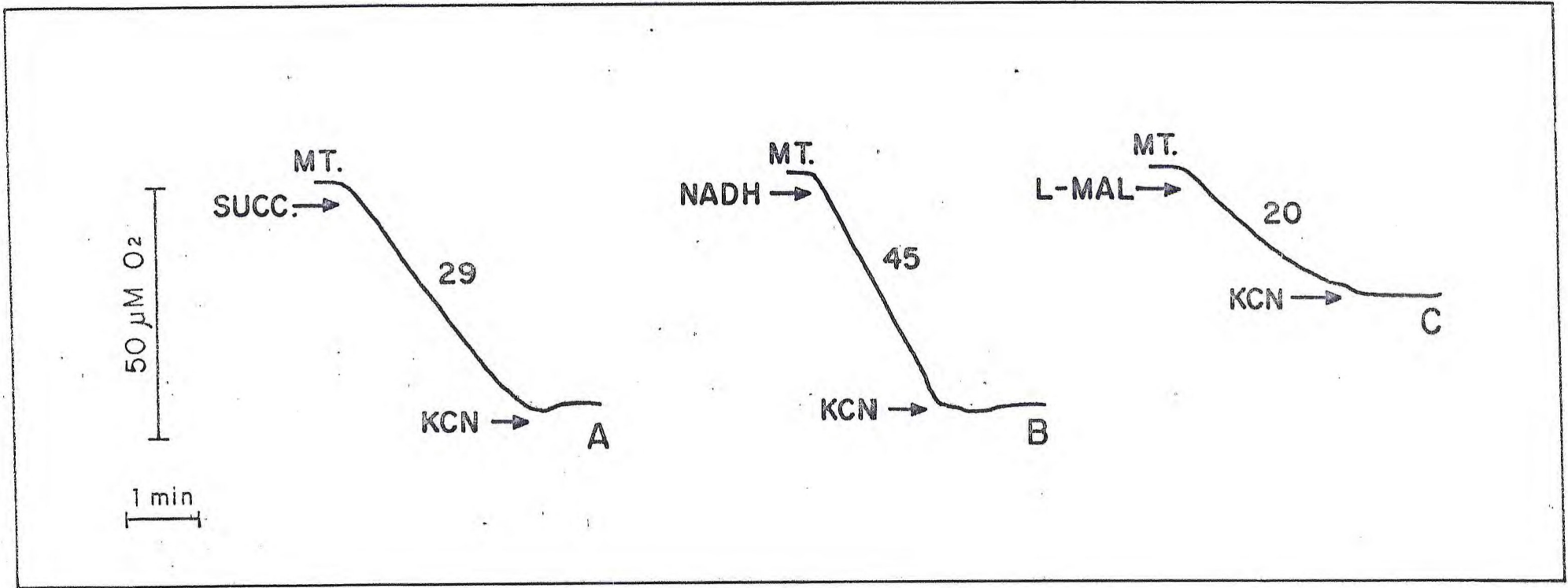




FIGURA 07: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a 64 horas de embebição em água em presença de (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato 33mM, mostrando o efeito do KCN 20  $\mu$ M, na atividade oxidativa. A quantidade de proteína mitocondrial foi 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

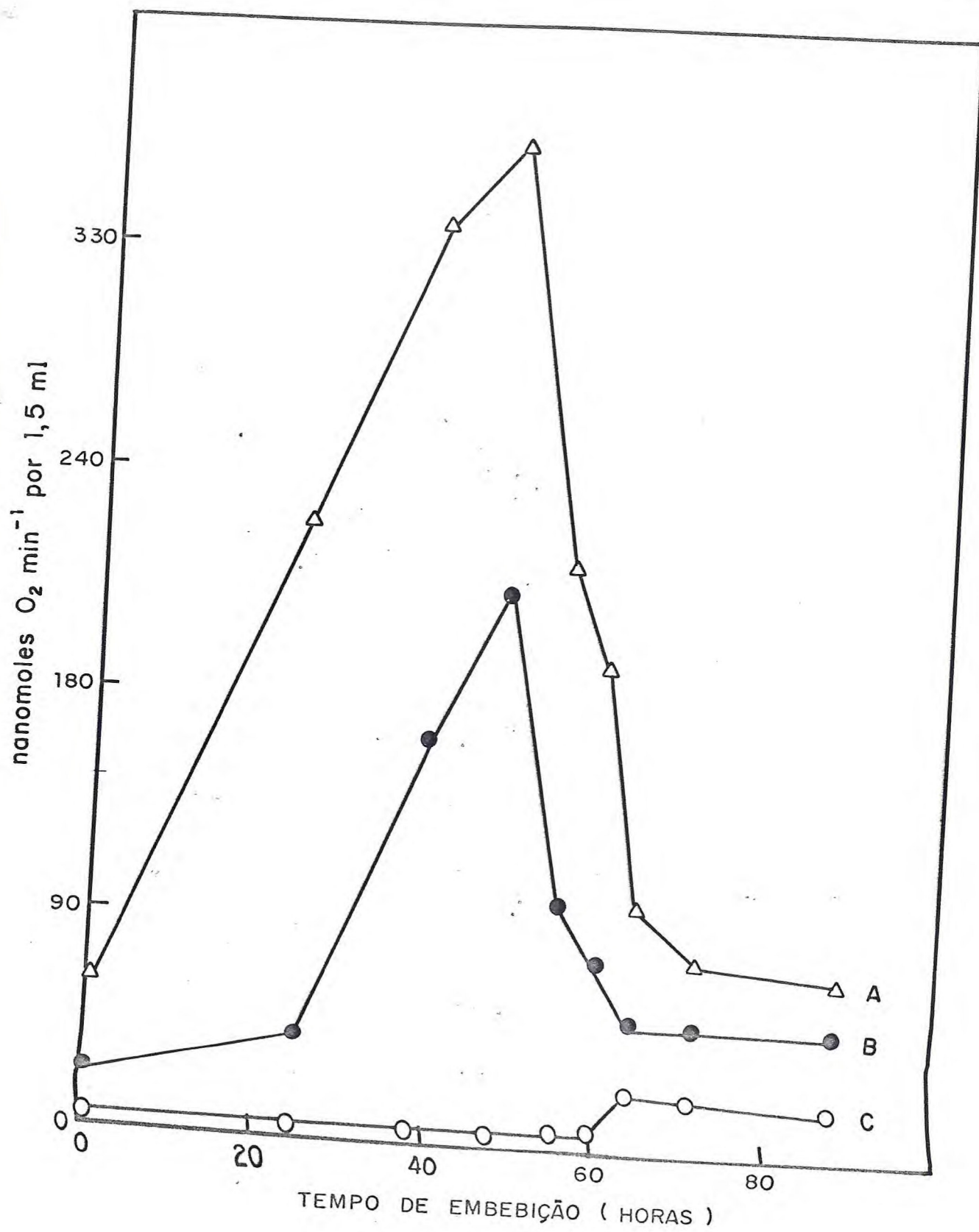


FIGURA 08: Consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a diferentes tempos de embebição em água; na oxidação de (A) NADH 1mM, (B) succinato 16mM e (C) L-malato 33mM, na presença de citocromo c 2,13  $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.



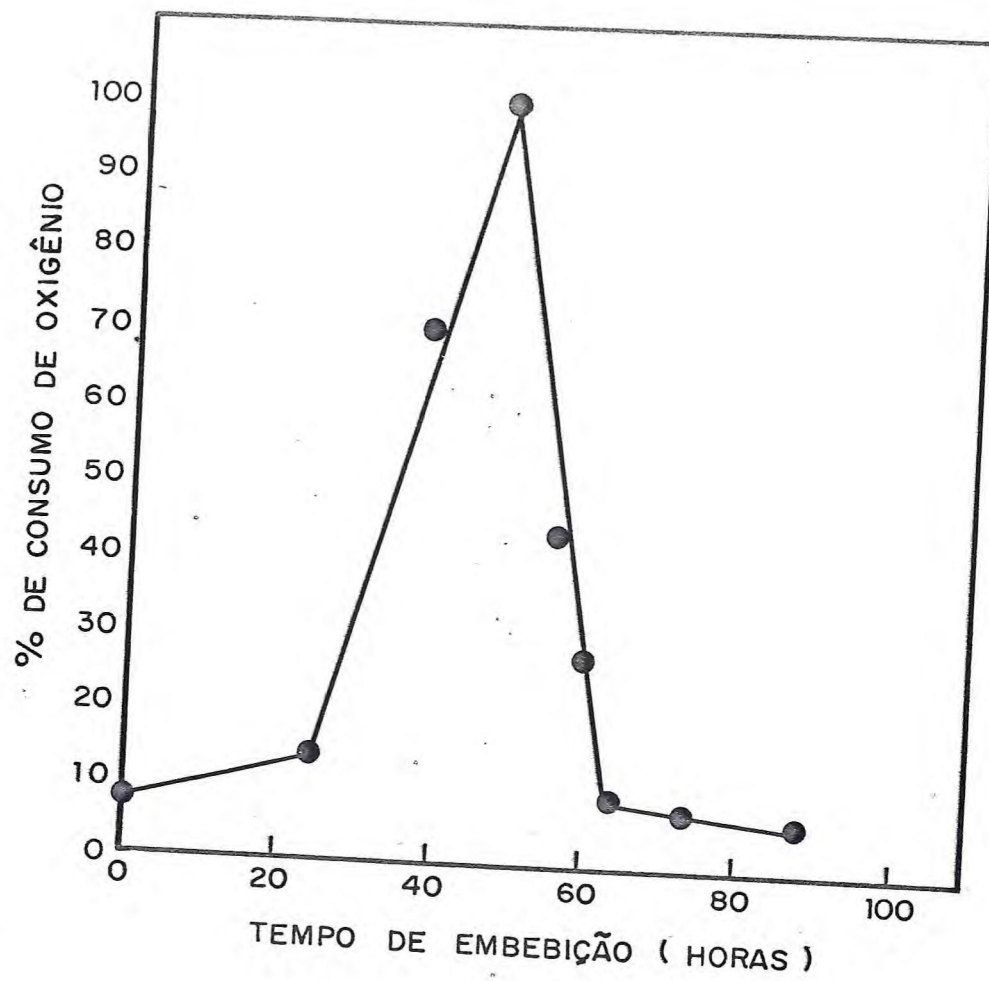


FIGURA 09: Respiração estimulada pelo citocromo c de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a diferentes tempos de embebição em água, tendo succinato 16mM como substrato. Os valores foram calculados pela diferença entre o consumo de oxigênio em presença e ausência de citocromo c, admitindo-se como 100% o valor do estímulo máximo do consumo de oxigênio. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

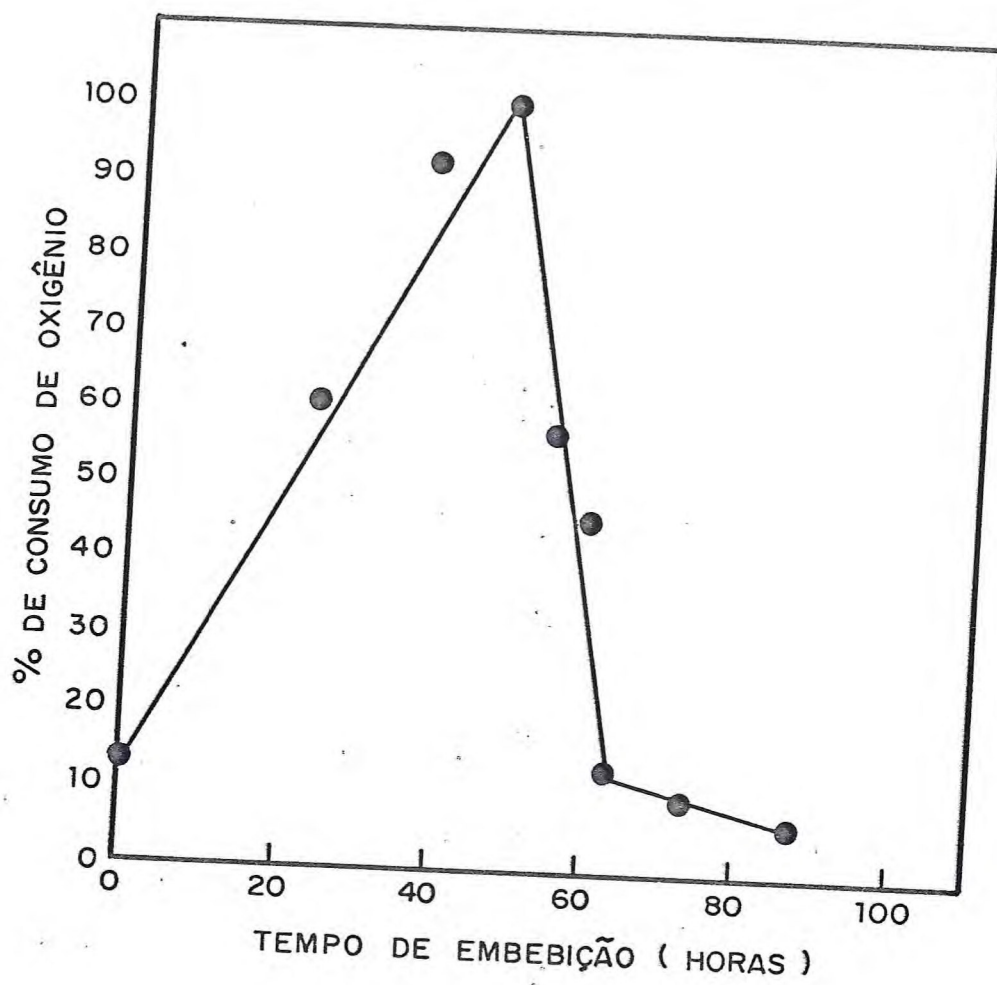




FIGURA 10: Respiração estimulada pelo citocromo c de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, submetidas a diferentes tempos de embebição em água, tendo NADH 1mM como substrato. Os valores foram calculados pela diferença entre o consumo de oxigênio em presença e ausência de citocromo c, admitindo-se como 100% o valor do estímulo máximo do consumo de oxigênio. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

TABELA II - Valores das relações controle respiratório (C.R.) e ADP/O de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô quiescentes e submetidas a diferentes tempos de embebição; em ausência e presença de citocromo c 2,13  $\mu$ M tendo o succinato, 16mM como substrato, com ADP 186  $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

Tempo de Embebição (Horas)	C.R.		ADP/O	
	-cit c	+cit c	-cit c	+cit c
0	-	-	-	-
24	-	-	-	-
39	-	-	-	-
48	-	-	-	-
55	-	-	-	-
60	-	-	-	-
64	2,44	2,44	0,98	1,06
72	2,04	2,70	1,06	1,33
88	2,38	2,97	1,52	1,65

TABELA III - Valores das relações controle respiratório (C.R.) e ADP/O de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô quiescentes e submetidas a diferentes tempos de embebição; em ausência e presença de citocromo c 2,13  $\mu$ M, tendo NADH 1mM como substrato, com ADP 186 $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

Tempo de Embebição (Horas)	C.R.		ADP/O	
	-cit c	+cit c	-cit c	+cit c
0	-	-	-	-
24	-	-	-	-
39	-	-	-	-
48	-	-	-	-
55	-	-	-	-
60	-	-	-	-
64	4,35	3,66	1,02	0,65
72	5,08	3,75	1,02	1,08
88	5,22	3,81	1,04	1,11



TABELA IV: Valores das relações controle respiratório e ADP/O de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô quiescentes e submetidas a diferentes tempos de embebição; em ausência e presença de citocromo c 2,13  $\mu$ M tendo L-malato 33mM como substrato, com ADP  $\mu$ l86 M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

Tempo de Embebição (Horas)	C. R.		ADP/O	
	-cit c	+cit c	-cit c	+cit c
00	-	-	-	-
24	-	-	-	-
39	-	-	-	-
48	-	-	-	-
55	-	-	-	-
60	-	-	-	-
64	4,00	3,90	2,15	2,22
72	4,27	5,36	2,04	2,01
88	6,07	5,92	2,15	2,35

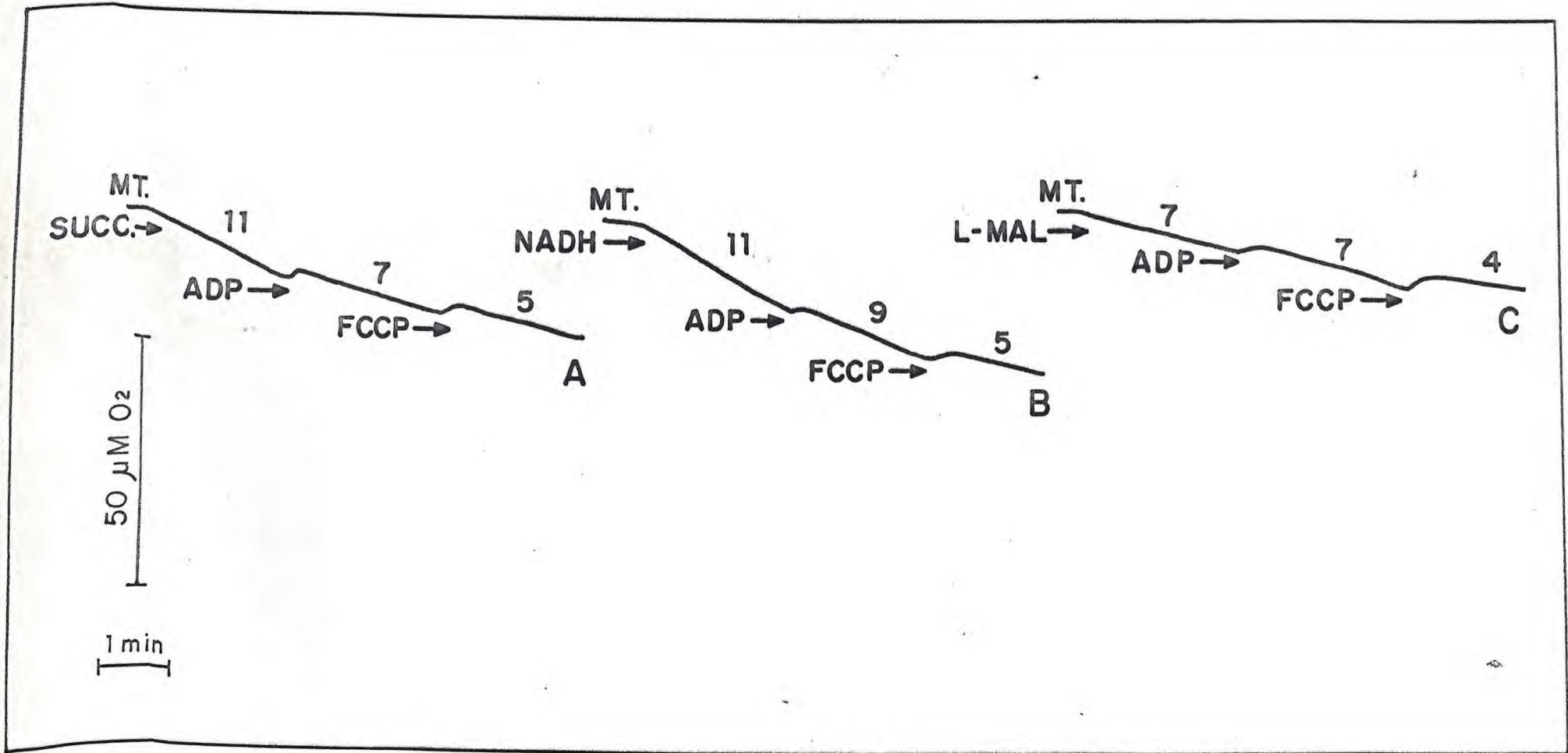
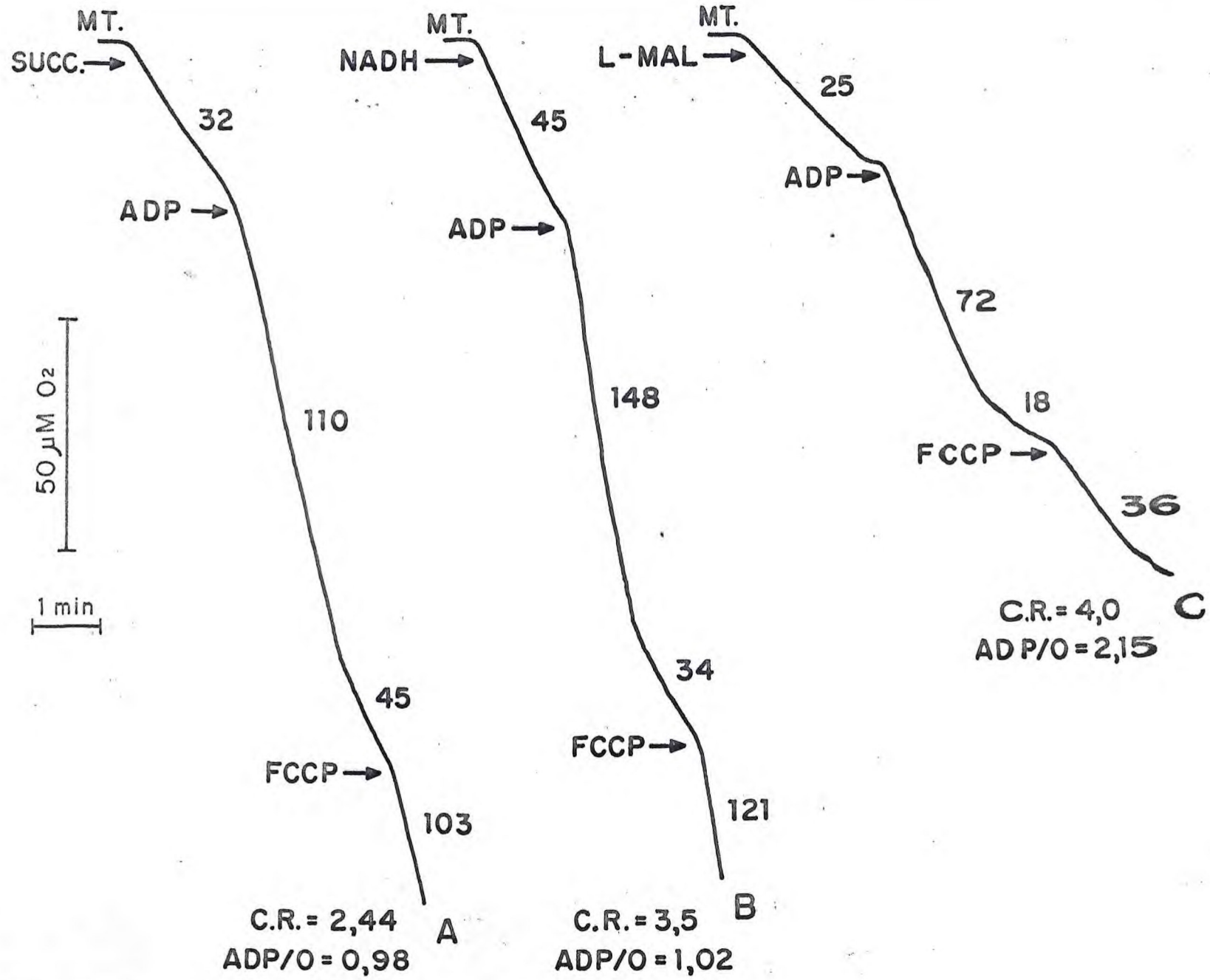


FIGURA 11: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, submetidas a 55 horas de embebição em água, em presença de: (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato 33mM, mostrando o efeito do FCCP 0,2  $\mu$ M, com ADP 186  $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.








FIGURA 12: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, submetidas a 64 horas de embebição em água, em presença de: (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato 33mM, mostrando o efeito do FCCP, 0,2  $\mu$ M, com ADP 186  $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

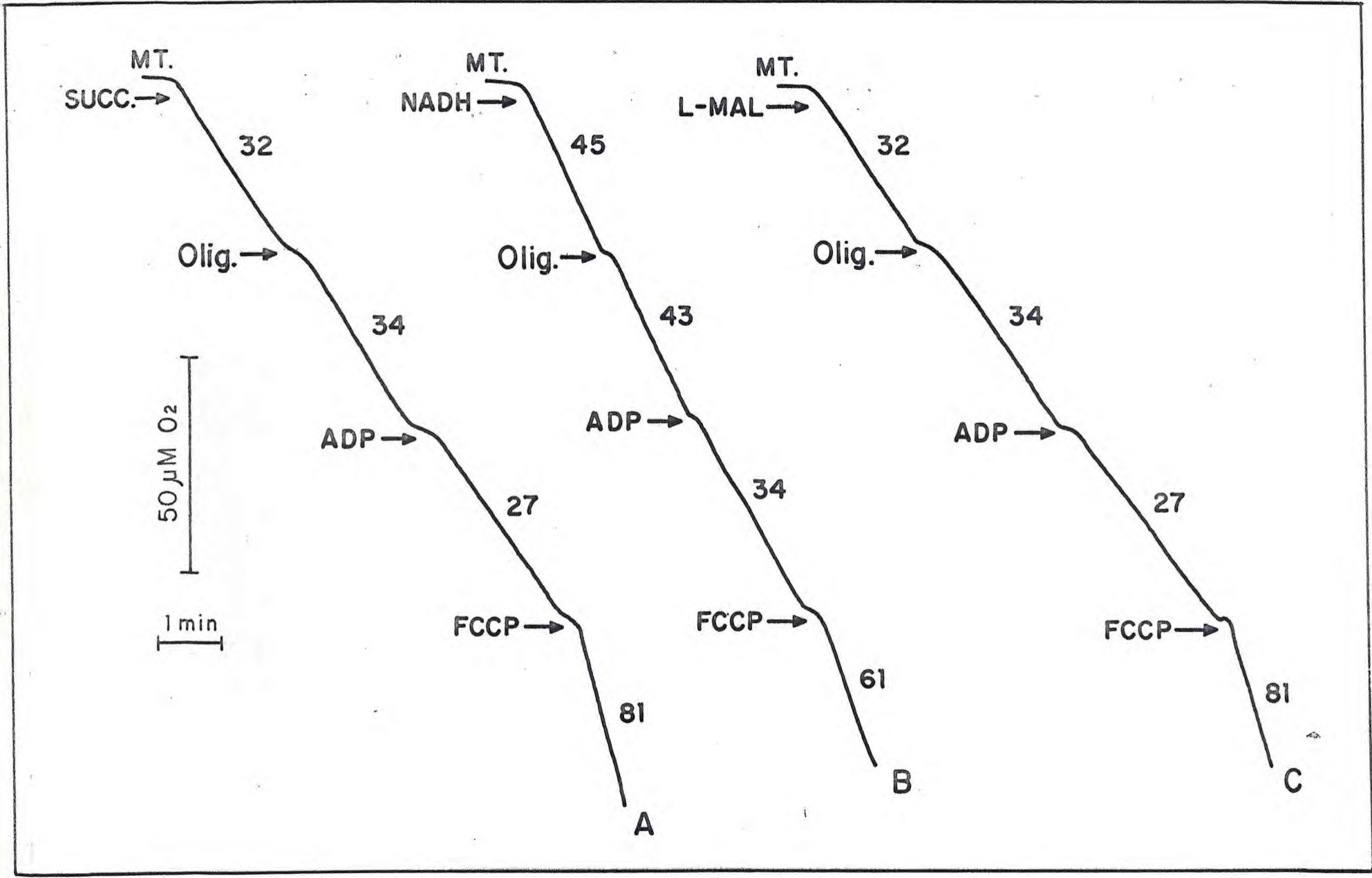




FIGURA 13: Traçado polarográfico de oxigênio de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a 64 horas de embebição em água, em presença de: (A) succinato 16mM, (B) NADH 1 mM e (C) L-malato 33mM, mostrando o efeito da oligomicina 3 µg/ml, e reversão da inibição por FCCP 0,2 µM, com ADP 186µM. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

### Espectros diferenciais da cadeia citocrômica

A determinação dos espectros diferenciais, a 77°K, permitiu a identificação de componentes da cadeia citocrômica de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes e de hipocótilos de plântulas colhidas após 6 dias de semeadura tomados como controle. Na determinação dos espectros diferenciais, as frações mitocondriais foram incubadas com succinato, ascorbato e ditionita; com a finalidade de por em evidência diferentes segmentos da cadeia citocrômica, uma vez que, succinato reduz especificamente o citocromo b, ascorbato reduz citocromo c, e ditionita reduz inespecificamente os componentes de toda cadeia respiratória.

As figuras 14 e 15 mostram respectivamente, os espectros diferenciais de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes e de hipocótilos de plântulas colhidas após 6 dias de semeadura, incubadas com (A) ditionita, (B) succinato e (C) ascorbato. Após estudo dos referidos espectros, foram identificados componentes da cadeia citocrômica de mitocôndrias de eixos embrionários quiescentes (Tab. V) e de mitocôndrias de hipocótilos (Tab. VI).

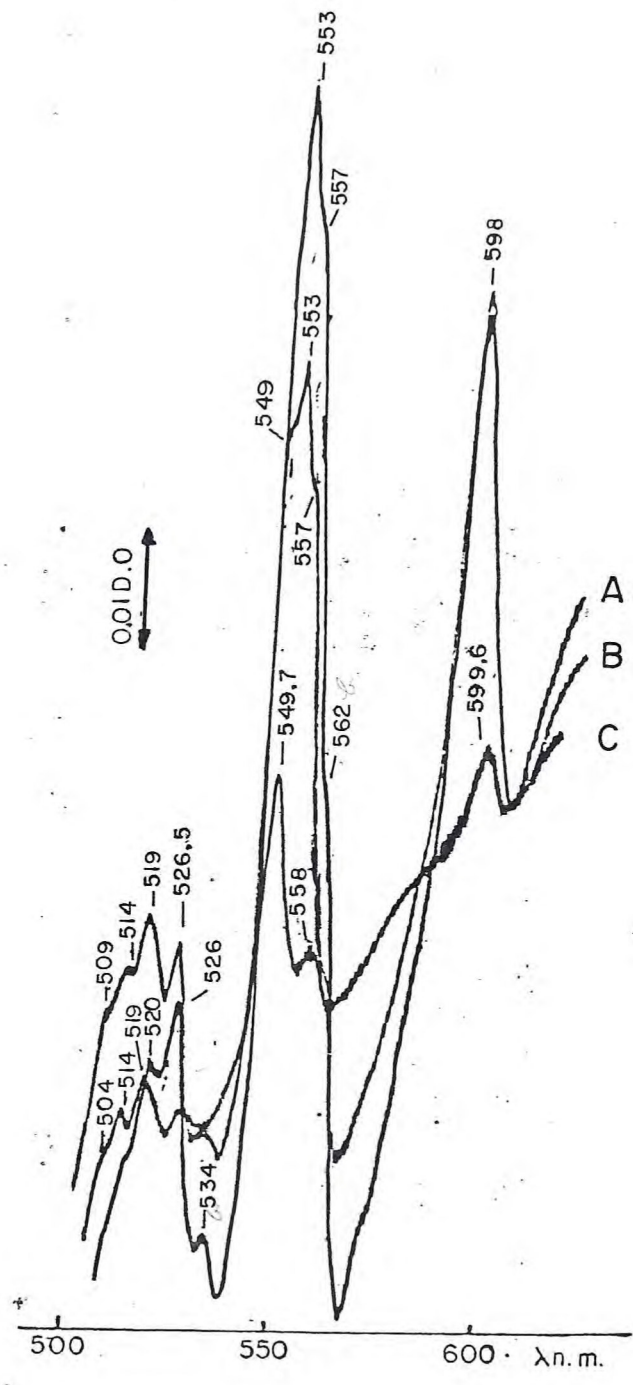




FIGURA 14: Espectros diferenciais da cadeia citocrômica de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, de terminados a 77°K. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 4,25 mg. As reduções da cadeia citocrômica foram feitas com (A) grãos de ditonita, (B) succinato 10mM e (C) ascorbato 2mM. A oxidação foi feita com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM. Caminho óptico de 3mm. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.

TABELA V - Identificação dos picos de absorção dos espectros diferenciais de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, determinados a 77°K. A quantidade de proteína mitocondrial foi de .... 4,25mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e na legenda da Figura 13.

Citocromos	Redutores da cadeia de transportadores de elétrons		
	Ditionita	Succinato	Ascorbato
a.a <sub>3</sub>	598	598	599,6
b	562 557 553 534	557 553	558
c+b	524		
c		509 514	509 514
c <sub>1</sub> +c	520	519 549	519 549,7

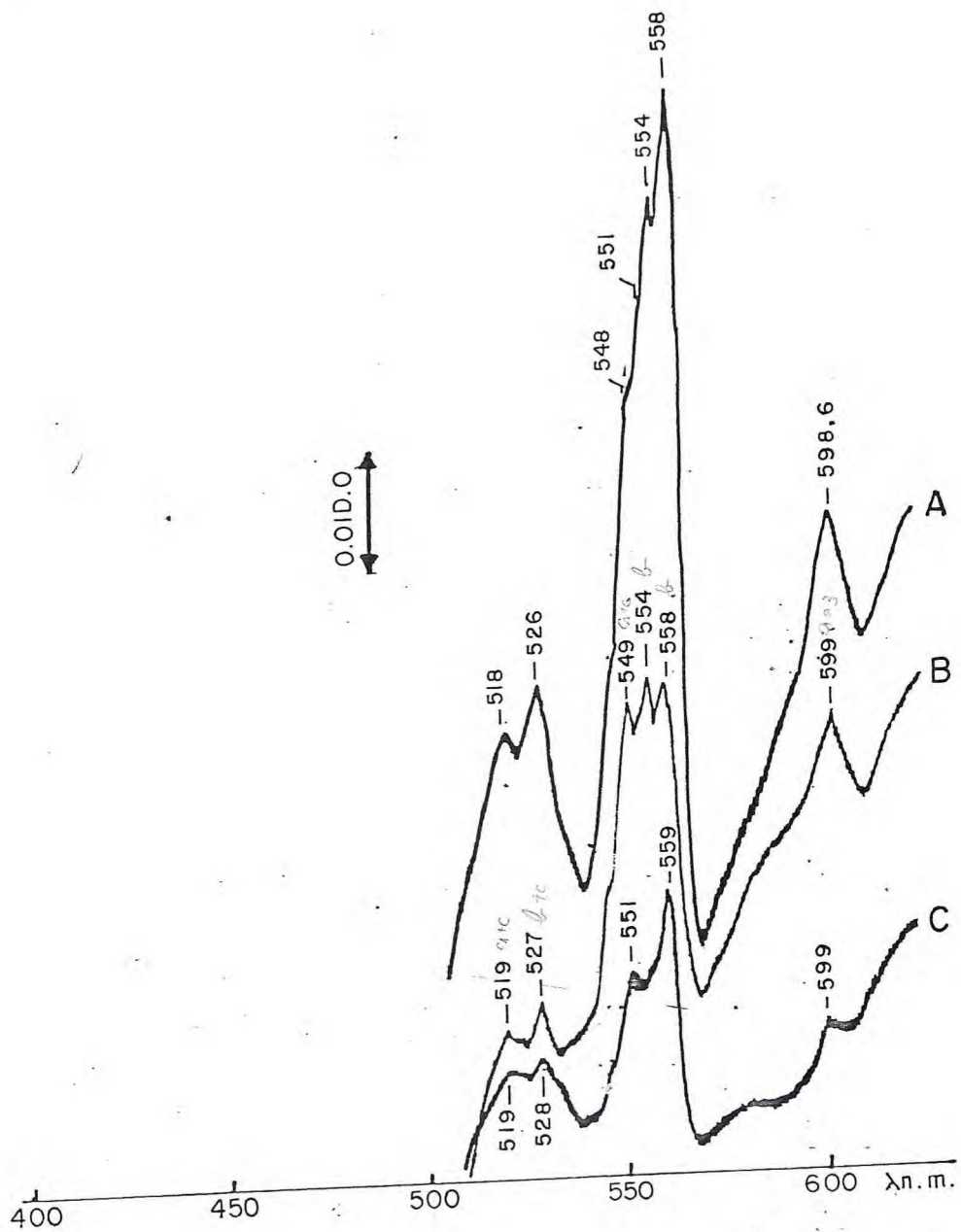


FIGURA 15: Espectros diferenciais da cadeia citocrômica de mitocôndrias de hipocôtilos de *Vigna unguiculata* cv. seridô, determinados a 77°K. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,72mg. As reduções da cadeia citocrômica foram feitas com: (A) grãos de ditonita, (B) succinato 10mM e (C) ascorbato 2mM. A oxidação foi feita com  $H_2O_2$  1mM. Caminho óptico de 3mm. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS.



TABELA VI - Identificação dos picos de absorção dos espectros diferenciais de mitocôndrias de hipocôtilos de *Vigna unguiculata* cv. seridô, determinados a 77°K. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,72mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e na legenda da Figura 14.

Citocromos	Redutores da cadeia de transportadores de elétrons		
	Ditionita	Succinato	Ascorbato
a.a <sub>3</sub>	598,6	599	599
b	558	558	559
	554	554	
c+b	526	527	528
c <sub>1</sub> +c	518	519	519
	548	549	
	551		

Perfil enzimático da fração mitocondrial de sementes quiescentes purificada após centrifugação em gradiente linear de densidade de sacarose.

A purificação da preparação mitocondrial, após centrifugação em gradiente linear de densidade de sacarose, possibilitou a determinação detalhada do perfil enzimático de mitocôndrias de sementes quiescentes. A citocromo-oxidase foi tomada como enzima marcadora de membrana mitocondrial interna. A matriz mitocondrial e os microcorpos foram marcados respectivamente, pelas enzimas malato-desidrogenase e catalase.

A figura 16 mostra as distribuições das atividades das enzimas citocromo-oxidase, malato-desidrogenase e catalase, e do conteúdo de proteína, após centrifugação da preparação mitocondrial em gradiente linear de densidade de sacarose, em função de suas posições no referido gradiente. Analisando-se as distribuições das atividades das enzimas e do conteúdo de proteína, verificou-se coincidência na localização dos picos da citocromo-oxidase, malato-desidrogenase e proteína, indicativas da presença da fração mitocondrial, na parte média do gradiente entre as frações 10 e 20. O pico da catalase, indicativo de microcorpos, localizou-se entre as frações de números 15 e 22. Assim, as mitocôndrias isoladas de sementes quiescentes mostraram-se possuidoras das clássicas enzimas marcadoras, onde não faltou o malato-desidrogenase, embora tenham sido pobremente funcionantes para o transporte de elétrons da cadeia respiratória em presença do L-malato.

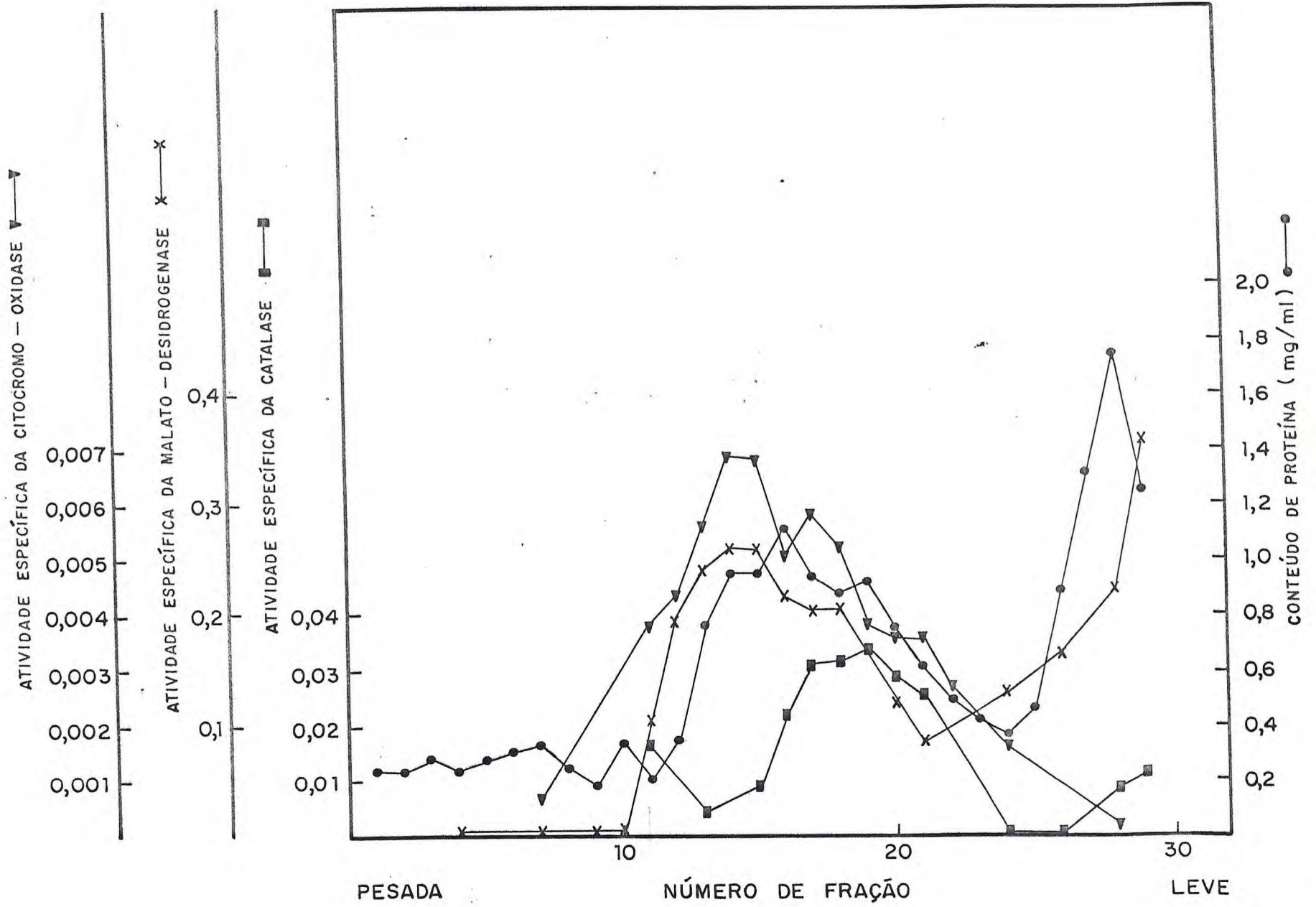


FIGURA 16: Distribuição do conteúdo protéico, atividades citocromo-oxidásica, malato-desidrogenásica e catalásica, após centrifugação em gradiente linear de densidade de sacarose (35-65%) da fração mitocondrial de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. seridô. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS. —●—●— conteúdo protéico em mg/ml; —▼—▼— atividade específica da citocromo-oxidase expressa em  $\mu$ moles de citocromo c oxidado por minuto, por mg de proteína; -x-x- atividade específica da malato-desidrogenase expressa em  $\mu$ moles de NADH oxidado por minuto, por mg de proteína; —■—■— atividade específica da catalase, expressa em inclinação (*slope*) da curva de absorção a 240 nm, por minuto por mg de proteína.



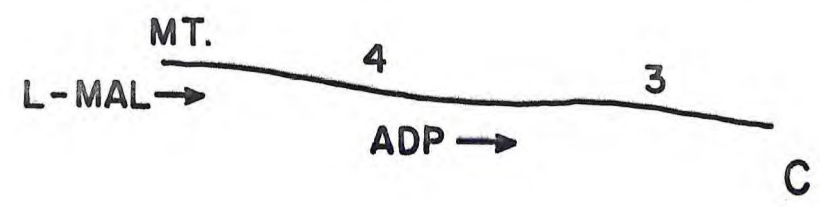
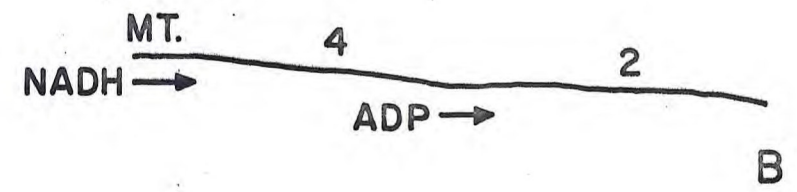
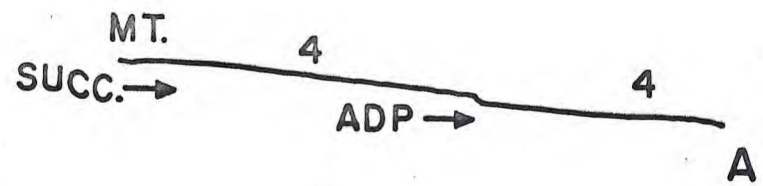
Caracterização funcional da fração mitocondrial isolada de cotilédones de sementes embebidas.

A caracterização da atividade oxidativa em mitocôndrias preparadas de cotilédones de sementes de feijão *seridô* mostra que a oxidação dos substratos succinato, NADH e L-malato é baixa em mitocôndrias de cotilédones de sementes quiescentes (Fig. 17); apresenta razoável aumento com 18 horas de embebição (Fig. 18), mantendo-se relativamente constante até 38 horas de embebição (Figs. 19 e 21); e parece decrescer com 48 horas de embebição (Fig. 22).

Quanto à atividade fosforilante, foi encontrado que somente mitocôndrias de cotilédones de sementes com 24 horas de embebição foram capazes de realizar um ciclo de fosforilação do ADP acoplada à respiração, durante a oxidação do succinato, NADH e L-malato (Fig. 19). Surpreendentemente, os valores da relação ADP/O em presença de succinato (Fig. 19 (A)) e L-malato (Fig. 19 (C)), foram mais altos do que os valores teóricos esperados. Verificou-se ainda que após uma nova adição de ADP, houve decréscimo da atividade oxidativa. Mitocôndrias de cotilédones de sementes quiescentes (Fig. 17) e de cotilédones de sementes embebidas pelos períodos de 18, 38 e 48 horas não apresentaram estímulo da atividade oxidativa, após a adição de ADP (Figs. 18, 21 e 22 respectivamente), como qualquer dos substratos testados.

O efeito do citocromo c sobre as atividades oxidativa e fosforilante, foi testado em mitocôndrias de cotilédones de sementes com 24 horas de embebição. A figura 20 mostra que o citocromo c estimulou o consumo de oxigênio, durante a oxidação do (A) succinato e (B) NADH, mas não teve efeito sobre a respiração com (C) L-malato. No que tange à fosforilação oxidativa, não foi registrada respiração

estimulada pelo ADP com (A) succinato e (B) NADH,parecendo que o efeito da estimulação da atividade oxidativa pelo ADP com estes substratos foi mascarada pelo estímulo provocado pelo citocromo c. No entanto, o citocromo c não impediu o estímulo do consumo de oxigênio pelo ADP durante a oxidação do (C) L-malato.



50  $\mu\text{M O}_2$   
1 min

FIGURA 17: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de cotilêdones de sementes quiescentes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, em presença de (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato 33mM mostrando o efeito do ADP 186  $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.



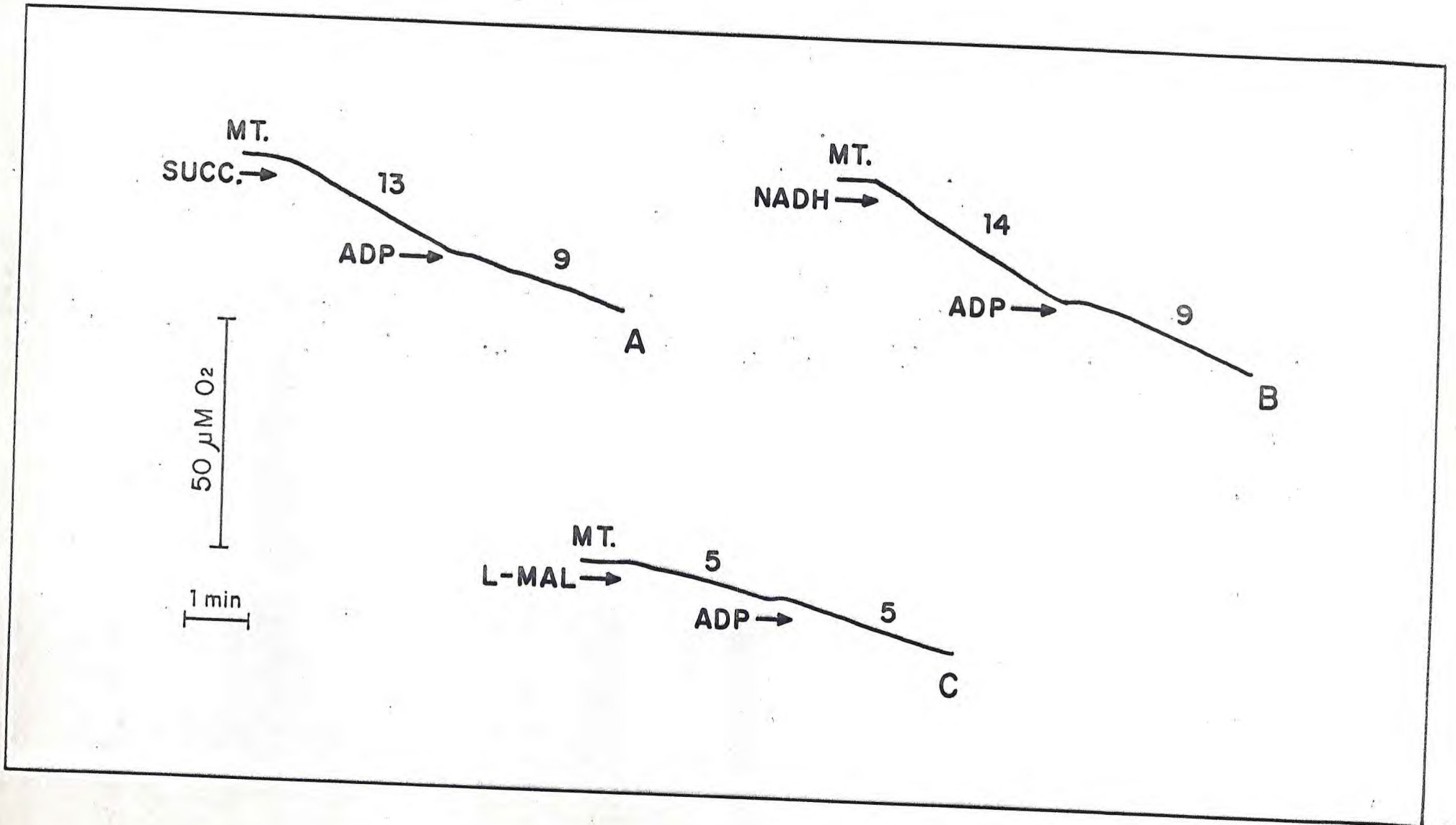


FIGURA 18: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de cotilêdones de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a 18 horas de embebição em água, em presença de (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato 33mM, mostrando o efeito do ADP 186  $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6 mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

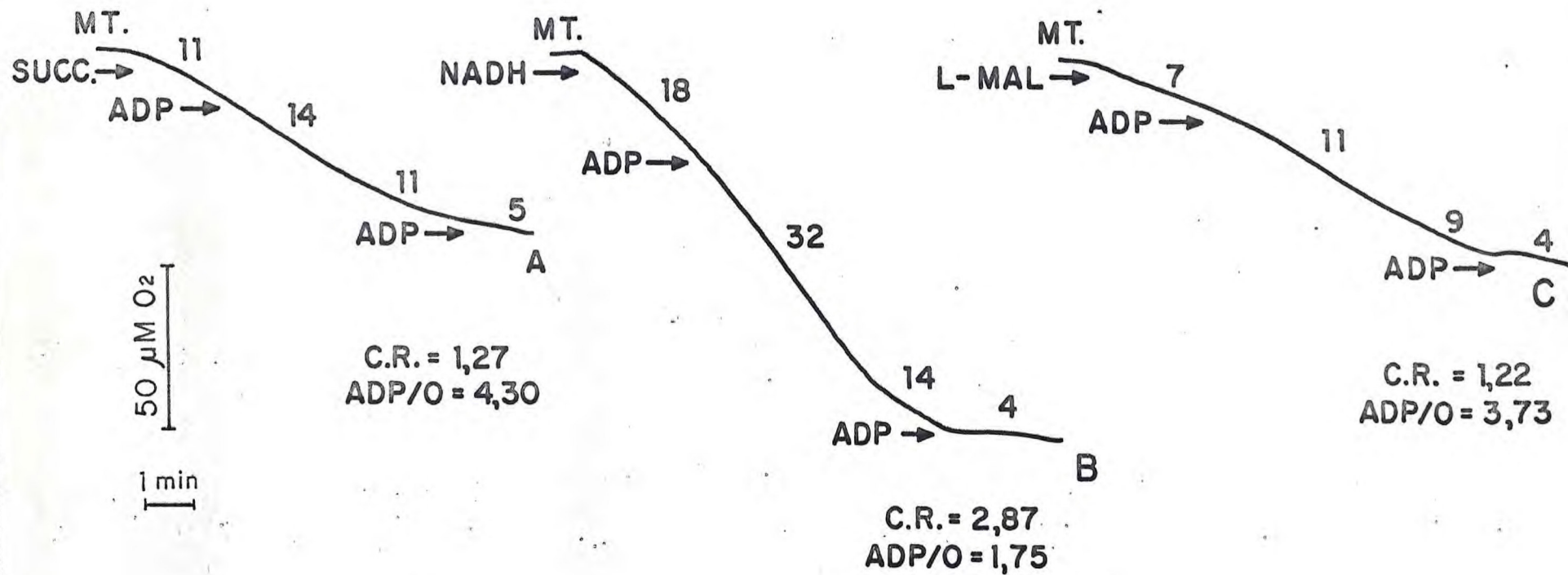


FIGURA 19: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de cotilédones de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a 24 horas de embebição em água, em presença de (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato 33mM, mostrando o efeito do ADP 186  $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.



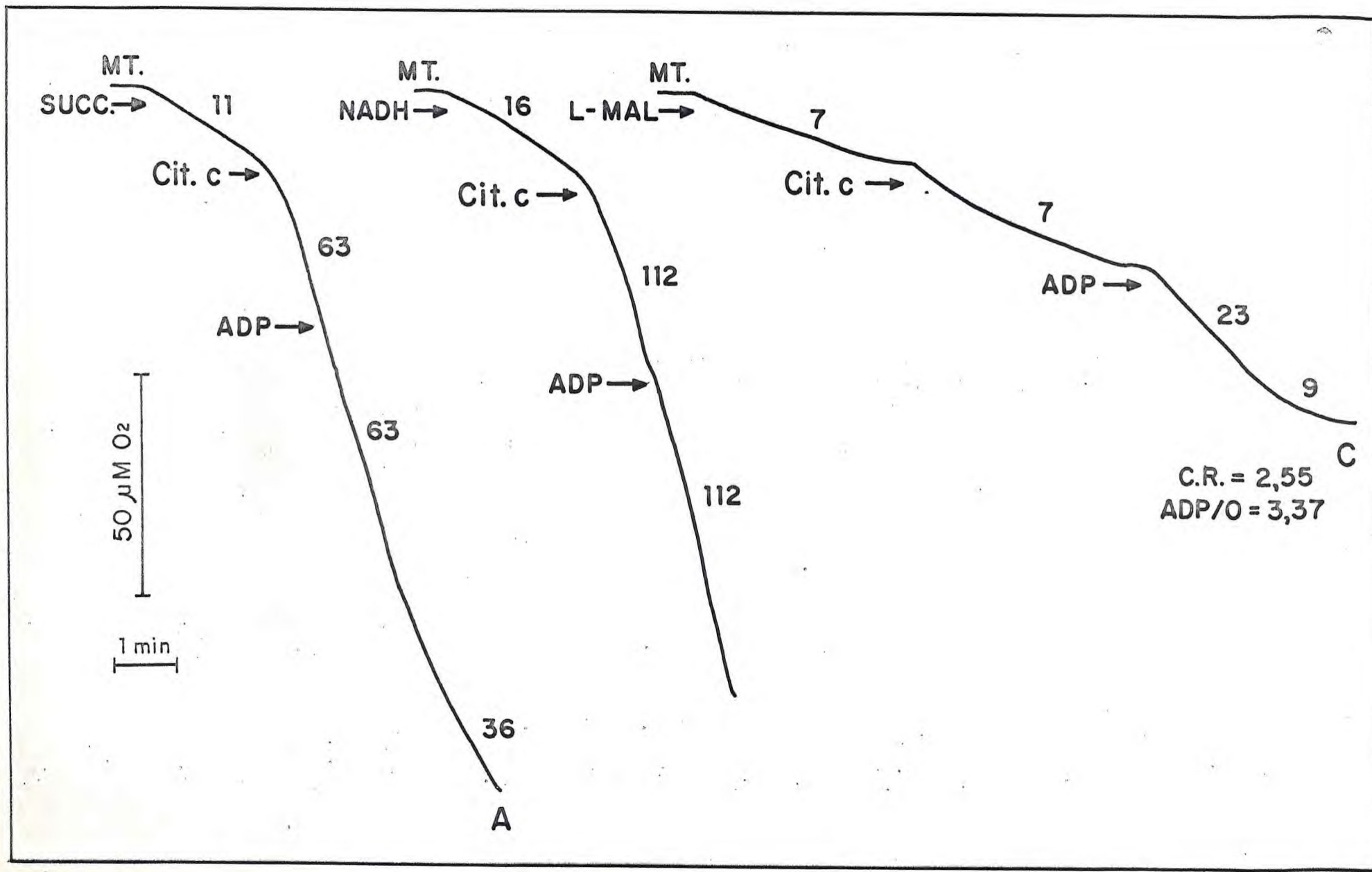


FIGURA 20: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio na presença de citocromo c  $2,13 \mu\text{M}$ , de mitocôndrias de cotilédones de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô, submetidas a 24 horas de embebição em água, em presença de: (A) succinato  $16\text{mM}$ , (B) NADH  $1\text{mM}$  e (C) L-malato, mostrando o efeito do ADP  $186 \mu\text{M}$ . A quantidade de proteína mitocondrial foi de  $1,6\text{mg}$ . As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

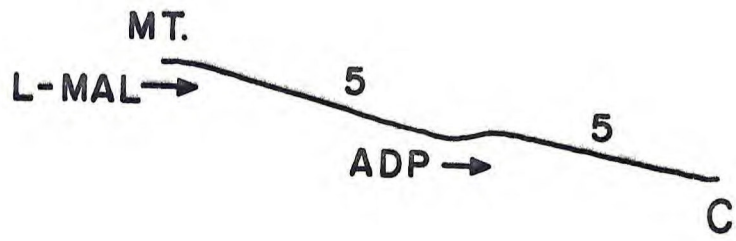
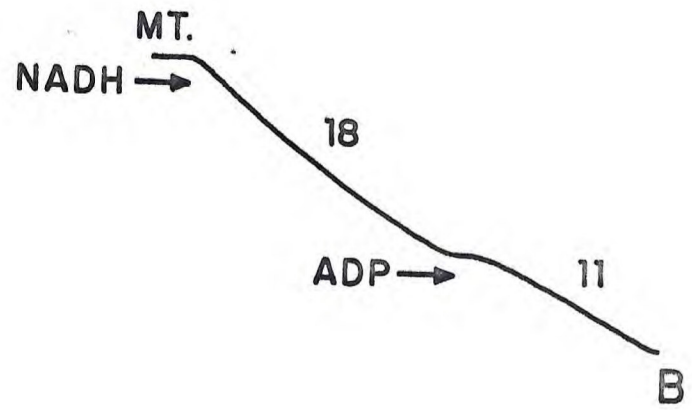
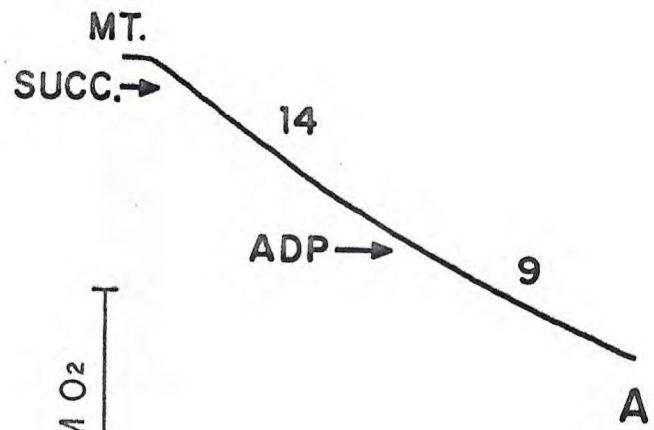


FIGURA 21: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de cotilédones de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a 38 horas de embebição em água, em presença de (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato 33mM, mostrando o efeito do ADP 186 $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.



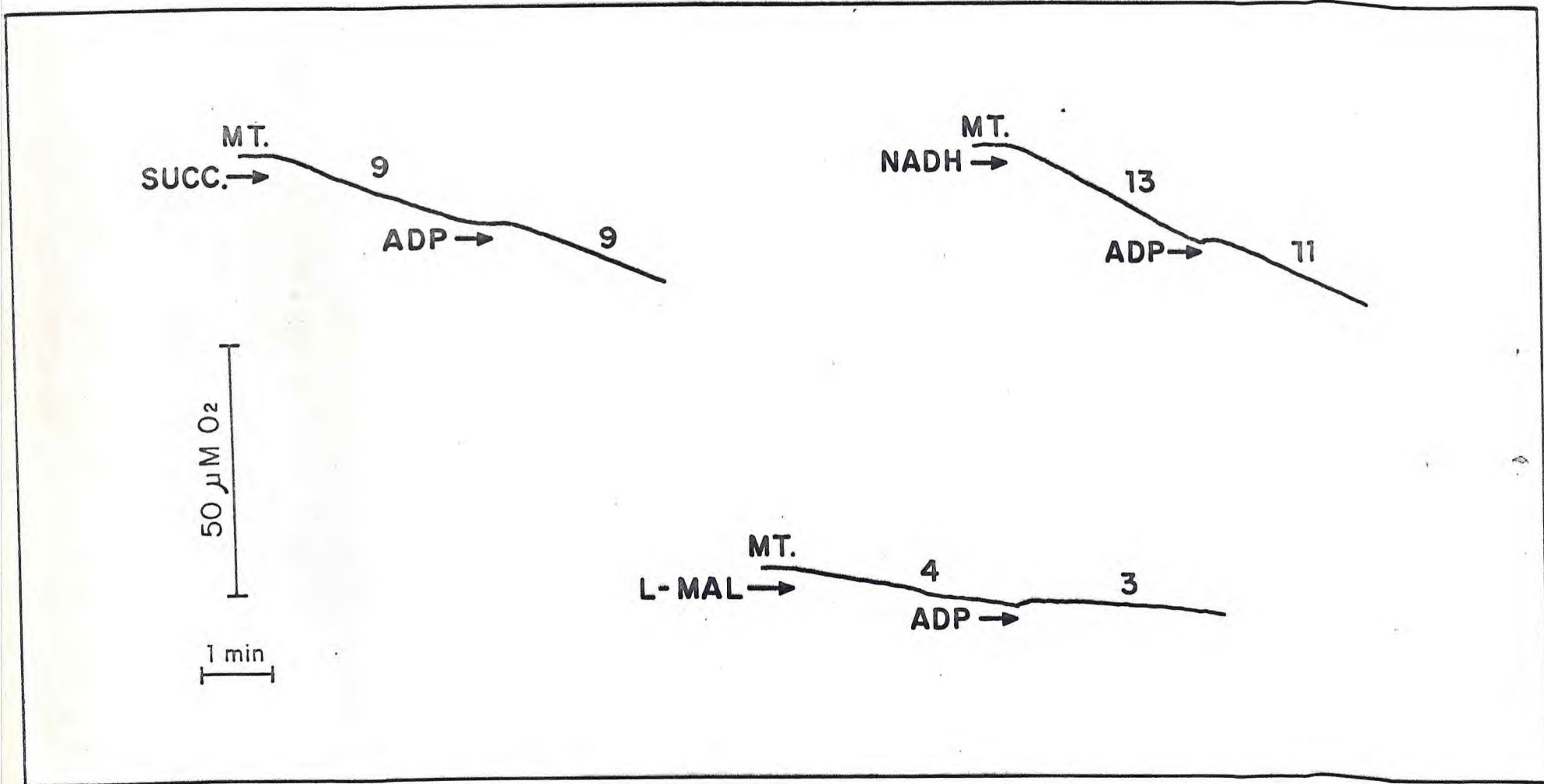


FIGURA 22: Traçado polarográfico do consumo de oxigênio de mitocôndrias de cotilédones de sementes de *Vigna unguiculata* cv. seridô submetidas a 48 horas de embebição em água, em presença de: (A) succinato 16mM, (B) NADH 1mM e (C) L-malato 33mM, mostrando o efeito do ADP 186 $\mu$ M. A quantidade de proteína mitocondrial foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da Tabela I e Figura 02.

## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostraram que não houve diferença na atividade mitocondrial, quando se tratava de mitocôndrias de sementes quiescentes e de mitocôndrias de eixos embrionários destacados das mesmas sementes (Tab. I, Figs. 02, 03, 04). Estes dados confirmam resultados preliminares (Denslow & Silva Lima, 1977) e se aproximam dos de Wilson & Bonner (1971). Foi evidenciado um baixo comprometimento do sistema mitocondrial, quando as sementes estão no estado quiescente, contudo a baixa taxa respiratória foi inibida pelo KCN, indicando participação da citocromo-oxidase.

Com o intuito de minimizar os efeitos dos danos mecânicos no processo de isolamento mitocondrial, bem como de tentarmos surpreender mais precocemente a atividade mitocondrial, oxidativa e fosforilante, estudos foram feitos com eixos embrionários, quiescentes ou embebidos de feijão seridô. Foi verificada uma baixa atividade respiratória que só aumentou após 60 horas de embebição das sementes em água, para atingir rapidamente o *plateau* com 64 horas de embebição (Fig. 06). Esta atividade foi também inibida pelo KCN (Fig. 07). Mesmo assim, a atividade fosforilante da fração mitocondrial só foi evidenciada após 64 horas de embebição (Tabelas II, III, IV e Figs. 11 e 12). Acreditamos que a atividade mitocondrial no estado quiescente e nos primeiros estágios da germinação, funciona como um elemento regulador do próprio processo germinativo, como foi antes sugerido por Wilson & Bonner (1971). Observamos na Figura 06 que a variação da atividade respiratória e a chegada a um máximo de consumo de oxigênio, foi brusca. Esta variação rígida parece ser devida às dificuldades técnicas enfrentadas no isolamento da fração mitocondrial deste material ve



getal, tornando difícil o apuro nos resultados obtidos. Os dados apresentados fornecem apenas um arcabouço muito vasto onde os problemas fisiológicos podem se delinear.

A respiração de mitocôndrias de sementes e de eixos embrionários quiescentes, com succinato e NADH como substratos, igualmente foi estimulada por citocromo c (Tab. I, fig. 04). Este fato foi encontrado também em mitocôndrias isoladas de eixos embrionários de sementes submetidas a diferentes tempos de embebição em água (Figs. 08, 09, 10). Os primeiros estudos que relataram uma ação estimuladora da atividade oxidativa de mitocôndrias de batata (*Solanum tuberosum* L. var. Norin I) por citocromo c foram feitos por Hackett *et al.* (1960). Contudo, em seu trabalho, a preparação mitocondrial não evidenciou controle respiratório nem foi possível determinar os valores da relação ADP/O. Neste caso foi feita a suposição de que a preparação mitocondrial vegetal sofrera danos decorrentes das dificuldades técnicas de isolamento. Nesta mesma linha de interpretação, situou-se o trabalho de Wiskich & Bonner (1963), também com batata (*Solanum tuberosum*). Por esta razão, eles introduziram uma série de modificações e cuidados na técnica da preparação mitocondrial e o efeito estimulador do citocromo c desapareceu. Esta influência do citocromo c, tal qual foi descoberto por Hackett *et al.* (1960), continuada por Wiskich & Bonner (1963) e ainda mais recentemente invocada por Douce *et al.* (1972) como critério de verificação da integridade mitocondrial é diferente do efeito do citocromo c estudado por Wilson & Bonner (1971) em mitocôndrias de eixos embrionários de amendoim. Este foi descrito como um efeito que aumenta a atividade oxidativa e fosforilante de mitocôndrias isoladas de eixos embrionários quiescentes e que desaparece à medida que a semente avança no processo germinativo. Foi constatado nestas mitocôndrias de tecidos em-



embrionários uma deficiência de citocromo c, sendo ã mesma atribuído um papel regulador do próprio processo de germinação. Em decorrência da deficiência de citocromo c haveria insuficiente taxa de oxidação, evitando-se a perda sem controle, de substratos da cadeia respiratória. Como se viu em eixos embrionários de feijão seridõ, não houve controle respiratório nos estágios mais precoces da germinação (Tabelas II, III e IV).

No caso de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes quiescentes de feijão seridõ, a hipótese de estar mos diante de efeito idêntico ao preconizado por Wilson & Bonner (1971), foi examinada, sendo determinados os espectros da cadeia citocrômica da preparação mitocondrial de eixo embrionário (Fig. 14, Tab. V). Simultaneamente, foi determinado o espectro da fração mitocondrial de hipocôtilos (Fig. 15, Tab. VI), como testemunha na verificação do conteúdo de citocromo c. Surpreendentemente, a concentração de citocromo c em mitocôndrias de eixos de sementes quiescentes foi comparável ã de hipocôtilos. Estávamos pois diante de situação diferente da encontrada por Wilson & Bonner (1971). Efetivamente, demonstramos a presença de citocromo c na preparação mitocondrial de eixos embrionários de sementes quiescentes (Fig. 14, Tab. V). Mas o fato é que o citocromo c apresentava-se inoperante, quando do funcionamento da cadeia respiratória.

Este efeito estimulador do citocromo c no fluxo de elétrons em mitocôndrias de tecidos considerados em processo de desenvolvimento foi recentemente observado em mitocôndrias de tecidos animais (Barret *et al.*, 1976; Spencer & Horton, 1979). Tal foi o caso observado em mitocôndrias de fígado de rato com 28 meses de idade (animais velhos) e com 5 a 10 meses de idade (animais jovens), por Spencer & Horton (1979). Em preparação oriundas de animais dos gru-

grupos velho e jovem, foi determinado o conteúdo de citocromo c, que se revelou idêntico. Com a readição de citocromo c verificou-se a restauração da atividade succino-oxidásica, que foi de 65% em animais velhos, sendo 100% em animais jovens. Foi sugerido então por Spencer & Horton (1979) uma modificação na fixação do citocromo c à membrana mitocondrial interna, cujo grau variava com a idade dos animais e que a adição de citocromo c poderia provocar uma restauração da atividade respiratória por rearranjo na membrana mitocondrial interna. Isto explicaria o aumento do fluxo de elétrons, mais acentuado em animais mais jovens e, por conseguinte, com maiores facilidades para um rearranjo provocado pelo citocromo c. Uma interpretação semelhante poderia ser atribuída aos dados de ativação do fluxo de elétrons pelo citocromo c em mitocôndrias de tecidos germinantes (jovens) a qual decresce com o tempo de germinação. O citocromo c nos estágios iniciais da germinação poderia estar em uma posição desfavorável na membrana mitocondrial interna, como mecanismo regulador para impedir o funcionamento da cadeia respiratória. Ao entrar em contato com a preparação mitocondrial o citocromo c provocaria uma modificação na arquitetura molecular da membrana mitocondrial, enquanto o citocromo c ainda não ocupou o seu lugar definitivo na mesma membrana, fazendo o citocromo c lá situado fora do sítio devido, ocupar a posição mais favorável para o funcionamento da cadeia respiratória. Esta seria a explicação para os dados de estímulo provocado pelo citocromo c com mitocôndrias de feijão seridô (Tab. I, Figs. 04, 08, 09, 10).

Embora tivéssemos encontrado aumento da atividade oxidativa em presença de succinato e NADH (Tabela I, Figs. 04, 08, 09, 10) provocado pelo citocromo c, os dados são insuficientes para uma apreciação mais acurada do efeito sobre a atividade fosforilante, tornada evidente após 64 horas de embebição das sementes (Tabelas II, III). Quanto



ã discrepância de resultados com os trabalhos de Wilson & Bonner (1971) que não encontraram citocromo c nas mitocôndrias de eixos embrionários de amendoim, além de terem usado outro tipo de vegetal, a determinação que fizeram do espectro da cadeia citocrômica, foi feita apenas em presença de ditonita onde a resolução do pico de citocromo c foi deficiente. No caso de feijão seridô, a presença de citocromo c só foi revelada com boa resolução em presença de succinato e ascorbato (Fig. 14, Tab. V).

Além dos dados referentes ao citocromo c da cadeia citocrômica de mitocôndrias de eixos embrionários quiescentes (Fig. 14, Tab. V) e de hipocótilos (Fig. 15, Tab. VI), merece considerações adicionais a classe de citocromo b. Um pico de absorção em 534nm foi encontrado em mitocôndrias de eixos embrionários (Fig. 14, Tab. V), quando a preparação foi tratada com ditonita, não sendo encontrado na preparação de hipocótilos (Fig. 15, Tab. VI). Isto sugere uma possível alteração na cadeia citocrômica, também ao nível da classe b, do tecido vegetal jovem embrionário do feijão.

As mitocôndrias de sementes (Tab. I) e de eixos embrionários, seja em estado quiescente (Fig. 03) seja nos primeiros tempos de embebição da semente (Fig. 06), não oxidaram vários substratos. Chama especial atenção a não oxidação do L-malato, mesmo em presença de citocromo c quando é sabido que ele é oxidado por mitocôndrias de tecidos vegetais, diferentemente das mitocôndrias de tecidos animais (Ikuma, 1972; Palmer, 1976). Por esta razão, tal fato foi melhor explorado em mitocôndrias de feijão seridô. As mitocôndrias isoladas de sementes quiescentes foram purificadas após centrifugação em gradiente de densidade de sacarose e apresentaram atividade malato-desidrogenásica (Fig. 16). A análise da distribuição das atividades enzimáticas foi coerente com a fração mitocondrial, vez que houve con-

concordância de localização dos picos de proteína, malato-desidrogenase e de citocromo-oxidase, enzima marcadora da membrana mitocondrial interna. A incapacidade das mitocôndrias de sementes quiescentes de oxidar malato, não parece portanto ser devida à ausência de malato-desidrogenase na fração mitocondrial. Denslow & Silva Lima (1977) encontraram uma atividade de 0,67  $\mu$ moles de NADH/min em mitocôndrias isoladas de 5g de sementes quiescentes, sugerindo que este nível de malato-desidrogenase é suficiente para manter, no mínimo, um baixo grau de oxidação do malato. Ainda por tais dados, foi sugerido que a oxidação do malato deveria ser comparável à do succinato. No entanto, mitocôndrias de sementes quiescentes oxidam lentamente o succinato e não oxidam malato. Nawa & Asahi (1971) separaram, após centrifugação em gradiente de densidade de sacarose de fração mitocondrial de cotilédones quiescentes de sementes de ervilha, 3 frações contendo citocromo-oxidase. Duas destas frações continham também malato-desidrogenase e numa outra, a atividade malato-desidrogenásica estava ausente. Em estudo comparativo da distribuição desta enzima juntamente com a presença de atividade citocromo-oxidásica, estes autores encontraram que a maior parte da atividade malato-desidrogenásica foi identificada com os picos correspondentes à fração pós-mitocondrial. Eles sugerem que a estrutura da mitocôndria de sementes quiescentes deve ser instável e a malato-desidrogenase é liberada das mitocôndrias, mas não está operante. No caso de *Vigna unguiculata* a malato-desidrogenase está presente nas mitocôndrias (Figura 16), e não é operante (Tabela I, Figs. 03, 06, 17). Possivelmente isto se deve a uma deslocalização da enzima que seria facilitada pela instabilidade do arranjo mitocondrial. Na hipótese de Sato & Asahi (1975), a malato-desidrogenase seria destacada da membrana no processo de separação. Logo, seria de supor que esta enzima, conhecida por sua situação matricial na mitocôndria, teria um grau de fixação frouxo. Este seria



mais um dado junto aos obtidos com o citocromo c para se especular sobre o arranjo peculiar dos elementos da cadeia respiratória, no curso da germinação. Consequentemente, isto reforça o argumento da arrumação não definitiva das enzimas relacionadas com o transporte de elétrons nas mitocôndrias de tecidos vegetais nas primeiras fases da germinação.

Diante do tardio aparecimento da oxidação acoplada à fosforilação (Tabelas II, III, IV e Figs. 11 e 12) com todas as características encontradas no tecido adulto, quais sejam desacoplamento pelo FCCP (Fig. 12), e inibição do estado 3 pela oligomicina revertida pelo FCCP (Fig. 13), procurou-se verificar as características do processo fisiológico de germinação das sementes de feijão seridô, através de uma curva de embebição de água acompanhada das variações ocasionadas no peso fresco das sementes (Fig. 05). A curva de embebição apresentou um padrão trifásico de absorção de água, conforme o proposto por Bewley & Black (1978), para as sementes sob condições ótimas de germinação e o encontrado por Wilson & Bonner (1971) em eixos embrionários germinantes de *Arachis hypogaea*.

A participação ativa do metabolismo energético, a julgar pelos dados de mitocôndrias de eixos embrionários de sementes embebidas, estava sendo tardio (64 horas) em relação ao padrão da curva de embebição das sementes. Com 64 horas de embebição, a semente já deveria ter passado por um período de atividade metabólica maior, que não seria explicado apenas, pelos dados fornecidos pelos estudos com mitocôndrias de eixos embrionários.

Contudo, não se pode deixar de considerar que a cinética das fases de embebição difere entre sementes de *Vigna unguiculata* e eixos embrionários de *Arachis hypogaea*. Nas primeiras, o peso fresco aumentou em torno de 100% até

24 horas de embebição, permanecendo constante até 30 horas, quando houve emergência da radícula e subsequentemente começou a crescer até atingir aproximadamente 250% do peso fresco da semente quiescente com 72 horas de embebição. Já para eixos embrionários de *Arachis hypogaea*, o aumento do peso fresco foi próximo de 200% nos primeiros 45 minutos de embebição, atingiu um *plateau* neste tempo e, por fim, cresceu a partir de 16 horas de embebição alcançando valores superiores a 400% com 48 horas. A diferença na cinética de absorção de água entre sementes de feijão seridô (Fig. 04) e eixos embrionários de *Arachis hypogaea* (Wilson & Bonner, 1971) pode ser atribuído à presença do tegumento na semente que limita o acesso de água à mesma (Meyer, 1977), como à natureza dos constituintes das diferentes partes da semente (Bewley & Black, 1978). Diferenças no padrão de absorção de água pelas sementes, têm sido também encontradas em diferentes variedades de uma mesma espécie de vegetal (Sefa-Ded & Stanley, 1979).

Passou-se então a estudar atividade metabólica de cotilédones de feijão seridô (Figs. 17, 18, 19, 20, 21 e 22). Verificamos que com 24 horas de embebição foi possível encontrar fosforilação de ADP acoplada ao transporte de elétrons com succinato, NADH e L-malato como substratos (Fig. 19). As condições de fosforilação não melhoraram com a presença de citocromo c (Fig. 20). Curiosamente, somente com 24 horas de embebição, foi possível evidenciar o acoplamento da oxidação à fosforilação (Fig. 17, 18, 19, 21 e 22). Possivelmente, isto decorre de uma dificuldade de ordem técnica, comum neste tipo de preparação, como já foi por nós mencionado e vem sendo por outros, que trabalham em assuntos correlatos (Wilson & Bonner, 1971).

O que os resultados apresentados permite sugerir é que, nos primeiros tempos de germinação de feijão seridô, a energia metabólica de origem mitocondrial, parece



ser oriunda dos cotilédones e só mais tarde parece haver participação ativa da fração mitocondrial do eixo embrionário. Não se tem condições de excluir a participação de energia, oriunda de outras vias metabólicas e do poder redutor gerado por atividade metabólica anterior ao processo de acoplamento da fosforilação.

## CONCLUSÕES

1) Mitocôndrias de sementes e eixos embrionários quiescentes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. seridô apresentam fraca atividade oxidativa, aparentemente por inoperância de certos componentes do sistema de transporte de elétrons como citocromo c e malato-desidrogenase;

2) A fraca atividade oxidativa de sementes e eixos quiescentes pode ser invocada como um mecanismo de controle da germinação;

3) A fosforilação oxidativa acoplada ao transporte de elétrons é de aparecimento tardio nos eixos embrionários e mais precoce nos cotilédones, no curso da germinação. Isto leva a crer que o metabolismo energético aeróbico nos primeiros estágios da germinação é oriundo do cotilédone, sendo o eixo embrionário resguardado para um período de atividade metabólica posterior;

4) Não está excluída dos estágios iniciais da germinação a energia oriunda da atividade mitocondrial pela produção de poder redutor, nem a contribuição de outras vias, mesmo anaeróbicas.



## LITERATURA CITADA

- Abdul-Bak, A. A . 1969 - Metabolism of barley seed during early hours of germination. Plant Physiol., 44:733-738.
- Appelmans, F., R. Wattiaux & C. de Duve. 1955 - Biochem. J. 59:438. Citado em Silva Lima & Vignais - 1968.
- Almeida Ramos, P. A. 1977 - Atividade oxidativa e fosforilante de mitocôndrias de feijão de corda pitiúba (Vigna sinensis (L.) Savi). Dissertação de Mestrado , Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil .
- Barret, M. C., D. J. Mills & A. A. Horton. 1976 - Lowered respiratory activity in hypo-osmotically shocked mitochondria without loss of cytochrome c. Biochem. J. 158:635-638.
- Bewley, J. D. & M. Black. 1978 - Imbibition, germination, and growth. *In* Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination, vol. 1, pp. 106-131. Springer-Verlag, New York.
- Bonner, W. D. Jr. 1967 - A general method for the preparation of plant mitochondria. *In* Methods in Enzimology (Eds. R. W. Estabroock & M. E. Pullman) , vol. 10, pp. 126-133. Academic Press, New York.

- Breidenbach, R. W., P. Castelfranco & C. Peterson. 1966 - Biogenesis of mitochondria in germinating peanut cotyledons. Plant Physiol., 41:803-809.
- Breidenbach, R. W., P. Castelfranco & R. S. Criddle. 1967 - Biogenesis of mitochondria in germinating peanut cotyledons II. Changes in cytochromes and mitochondrial DNA. Plant Physiol., 42:1035-1041.
- Chance, B. & G. R. Williams. 1955 - Simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. Nature., 75:1120-1121.
- Chance, B. 1965 - Techniques for the assay of the respiratory enzymes. *In* Methods in Enzymology (Eds. S.P. Colowick & N.O. Kaplan), vol. 4, pp.273-329. Academic Press, New York.
- Cherry, J. H. 1963 - Nucleic acid, mitochondria, & enzyme changes in cotyledons of peanut seeds during germination. Plant Physiol., 38:440-446.
- Cossins, E. A. & E. R. Turner. 1959 - Utilization of alcohol in germinating pea seedlings. Nature., 183:1599-1600.
- \_\_\_\_\_. 1962 - Losses of alcohol and alcohol dehydrogenase activity in germinating seeds. Ann. Bot., 26:591-597.

Cossins, E. A. & E. R. Turner. 1963 - The metabolism of ethanol in germinating pea seedlings. J. Expt. Bot., 14:290-298.

Cossins, E. A. 1964. - Formation and metabolism of lactic acid during germination of pea seedlings. Nature., 203:989-990.

Denslow, N. D. & M. Silva Lima. 1977 - The organization of electron transport chain in mitochondria of dry bean (Vigna sinensis cv. seridõ). Resumos 6º Encontro Anual da SBBq. 38. Caxambu-MG Brasil.

Douce, R., E. L. Christensen & W. D. Bonner, Jr. 1972 - Preparation of intact plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 46:148-160.

Eldan, M. & A. M. Mayer. 1972 - Evidence for activation of NADH-cytochrome c reductase during germination of lettuce. Physiol. Plant., 26:67-72.

Fernandes de Melo, D. 1979. - Estudo da atividade respiratória, da fosforilação oxidativa e da translocação de nucleotídeos de adenina em mitocôndrias de sorgo (Sorghum bicolor (L.) Moench). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brasil.



- Gornall, A. G., J. Bardawill & M. M. David. 1949 - Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. J. Biol. Chem., 177:651-766.
- Hackett, D. P., D. W. Haas., S. K. Griffiths & D. J. Niederpruem. 1960 - Studies on development of cyanide-resistant respiration in potato tuber slices. Plant Physiol., 35:8-19.
- Hagihara, B. 1961 - Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. Biochim. Biophys. Acta., 46:139-142.
- Howell, R. W. 1961 - Changes in metabolic characteristics of mitochondria from soyabean cotyledons during germination. Physiol. Plant., 11:89-96.
- Ikuma, H. & W. D. Bonner, Jr. 1967 - Properties of higher plant mitochondria. I. Isolation and some characteristics of tightly-coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotyls. Plant Physiol., 42:67-75.
- Ikuma, H. 1970 - Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. Plant Physiol. 45:773-781.



- Ikuma, H. 1972 - Electron transport in plant respiration. Ann. Rev. Plant Physiol., 23:414-436.
- Kollbøffel, C. 1970.-Oxidative and phosphorylative activity of mitochondria from pea cotyledons during maturation of the seed. Planta (Berl)., 91:321-328.
- \_\_\_\_\_. 1970. Alcohol dehydrogenase activity in the cotyledons of peas during maturation and germination. Acta Bot. Neerl., 19:539-545.
- \_\_\_\_\_. & J. V. Sluys. 1970 - Mitochondrial activity germination. Acta Bot. Neerl., 19:503-508..
- Lehninger, A. L. 1970 - Metabolic and energy-transfer pathways: a survey. *In* Biochemistry, pp. 267-288 , 365-393. Worth publishers, Inc, New York.
- Luck, H. 1965 - Catalase. *In* Methods of Enzymatic Analysis (Ed. Hans-Ulrich Bergmeyer), pp.885-894 . Academic Press, New York.
- Mayer, A. M. & A. Poljakoff-Mayber. 1966 - Metabolism of germinating seeds. *In* The Germination of Seeds (Eds. P.F. Wareing & A. W.Galston), vol. 3, pp. 101-156 . Pergamon Press, New York.

Mayer, A. M. 1977 - Metabolic control of germination. In The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination (Ed. A.A.Khan), pp.357-383. Horth-Holland Publishing Company, Amsterdam.

Morohashy, Y. & S. Shimokoriyama. 1975 a - Further studies on glucose catabolism in the early phases of germination of Phaseolus mungo seeds. J.Exp.Bot., 26:927-931.

\_\_\_\_\_. 1975 b - Development of glycolytic and mitochondrial activities in the early phase of germination of Phaseolus mungo seeds. J.Exp.Bot., 26: 932-938.

Nawa, Y & T. Asahi. 1971 - Rapid development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination. Plant Physiol., 48:671-674.

\_\_\_\_\_. 1973 - Relationship between the water of pea cotyledons and mitochondrial development during the early stage of germination. Plant & Cell Physiol., 14: 607-610.

\_\_\_\_\_. 1973 - Biochemical studies on development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination. Plant Physiol., 51:833-838.

- Nawa, Y., Y. Izawa & T. Asahi. 1973 - Effect of the pea embryo on formation and degeneration of the mitochondrial membrane in cotyledons during germination. Plant & Cell Physiol., 14:1073-1080.
- Ochoa, S. 1955 - Malic dehydrogenase from pig. *In* Methods in Enzymology (Eds. S.P.Colowick & N.O.Kaplan), vol.1, pp.735-739. Academic Press, New York.
- Öpik, H. & E. W. Simon. 1963 - Water and respiration of bean cotyledons. J. Exp. Bot., 14:299-310.
- Palmer, J. M. 1976 - The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. Ann. Rev. Plant. Physiol., 27:133-157.
- Parish, J.H. 1972 - Fractionation. *In* Principles and practice of experiments with nucleic acids, pp.126-171. Longman Group Limited, London.
- Sato, S. & T. Asahi. 1975 - Biochemical properties of mitochondrial membrane from dry pea seeds and changes in the properties during imbibition. Plant Physiol., 56:816-820.



- Sefa-Deded, S. & D. W. Stanley. 1979 - The relationship of microstructure of cowpeas to water absorption and dehulling properties. Cereal Chem., 56:379-386.
- Silva Lima, M. & P. V. Vignais. 1968 - Localisation et fonction de la GTP-AMP phosphotransférase dans les mitochondries de foie de rat. Bull. Soc. Chim. Biol. , 50:1833-1848.*
- Silva Lima, M., P. A. Pinheiro & D. Fernandes de Melo . 1974 - Comparison between mitochondria isolated from seridō bean (Vigna sinensis cv. seridō) and rat-liver: substrate utilization and influence of rotenone and 2,4 dinitrophenol. Rev. Brasil. Biol., 34:303-308.
- Silva Lima, M., N. D. Denslow & D. Fernandes de Melo . 1977 - Atractyloside inhibition of adenine nucleotide translocation in mitochondria from hypocotyls of Vigna sinensis cv. seridō. Physiol. Plant., 41:193-196.
- Solomos, T., S. S. Malhotra, S. Prasad., S. K. Malhotra & M. Spencer. 1972 - Biochemical and structural changes in mitochondria and other cellular components of pea cotyledons during germination. Can. J. Biochem., 50:725-737.
- Spencer, J. A. & A. A. Horton. 1979 - Age-dependent decrease in succinate oxidase activity on re-addition of cytochrome c to depleted mitochondria. Biochem. Soc. Trans., 7:1260-1262.



- Srivastava, L. M. & R. E. Paulson. 1968 - The fine structure of the embryo of Lactuca sativa. II. Changes during germination. Can. J. Botany., 46:1447-1453.
- Verdcourt, B. 1970 - Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the "Flora of Tropical East Africa": IV. Kew Bull., 24:507-569.
- Verleur, J. D. 1965 - Studies on the isolation of mitochondria from potato tuber tissue. Plant Physiol., 40:1003-1007.
- Walton, D. C. 1966 - Germination of Phaseolus vulgaris . I. Resumption of axis growth. Plant Physiol., 41:298-302.
- Wilson, S. B. & W. D. Bonner. 1971 - Studies of electron transport in dry and imbibed peanut embryos. Plant Physiol., 48:340-344.
- Wiskich, J. T. & W. D. Bonner. 1963 - Preparation and properties of sweet potato mitochondria. Plant Physiol., 38:594-604.
- Yentur, S. & A. C. Leopold. 1976 - Respiratory transition during seed germination. Plant Physiol., 57:274-274.

## PUBLICAÇÕES

12 - G.1.12 ATIVIDADES OXIDATIVA E FOSFORILANTE DE MITOCÔNDRIAS DE *Vigna sinensis* (L.) Savi, cv. seridô NO CURSO DA GERMINAÇÃO. T. Pereira de Jesus e M. Silva Lima (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará).

O estudo de mitocôndrias de sementes quiescentes já mostrou um funcionamento deficiente da cadeia de transportadores de elétrons e da fosforilação oxidativa associada. O presente trabalho caracteriza as atividades respiratória e fosforilante de mitocôndrias de eixos embrionários com diferentes tempos de embebição. As mitocôndrias foram isoladas de sementes germinadas em papel úmido, na obscuridade e o consumo de  $O_2$  determinado polarograficamente. Com 48hs de embebição, as mitocôndrias já apresentaram consumo de  $O_2$  em presença de malato e consumo de  $O_2$  em presença de succinato mais elevado do que de mitocôndrias de eixos de sementes quiescentes. Igualmente, apenas a respiração com succinato mostrou-se dependente de citocromo c. Também não houve fosforilação de ADP acoplada à respiração. Com 72hs de embebição, houve aumento do consumo de  $O_2$  com os mesmos substratos, conservando ainda dependência de citocromo c, da respiração em presença de succinato. Contudo, já houve relação ADP:O e C.R. (controle respiratório) com valores mais baixos do que os de tecidos adultos. Com 88hs os resultados foram idênticos aos de mitocôndrias de tecidos adultos, com respiração em presença de succinato independente de citocromo c, e valores da relação ADP:O e C.R. próximos aos teóricos. Uma determinação do espectro de citocromos da cadeia de transportadores de elétrons, mostrou presença de citocromo c em concentrações comparáveis às de mitocôndrias normalmente funcionantes de hipocótilos de feijão. Os resultados apresentados colocam-nos diante da seguinte alternativa: 1- as mitocôndrias ao longo da germinação passariam de estágio supostamente imaturo para estágio maduro com rearranjo da membrana interna; 2- mitocôndrias novas plenamente funcionantes seriam formadas no correr da germinação. (Auxílios Financeiros: UFAL, CNPq e FINEPE).



ATIVIDADE MITOCONDRIAL NO CURSO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE Vigna sinensis (L.) Savi  
cv. seridô.

Terezinha Pereira de Jesus e Maria da Guia Silva Lima. Dept<sup>o</sup> de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. Caixa Postal, 1065. 60.000, Fortaleza-Ceará.

Mitocôndrias de vegetais têm sido responsabilizadas pelo controle do processo de germinação, seja por incapacidade de realizarem fosforilação oxidativa, seja por apresentarem uma cadeia de transportadores de elétrons deficiente em sua composição. O presente trabalho é um estudo da atividade oxidativa e fosforilante de mitocôndrias isoladas de sementes de feijão seridô, no curso da germinação. Em sementes e eixos quiescentes há fraca atividade oxidativa, medida polarograficamente em presença de succinato e NADH que aumenta com a adição de citocromo c. O malato praticamente não é oxidado, mesmo com a adição de citocromo c. Não há atividade fosforilante em presença dos 3 citados substratos. Mitocôndrias de sementes quiescentes purificadas em gradiente de sacarose, apresentaram atividade malatodesidrogenásica e a análise espectral da cadeia citocrômica revelou a presença de citocromo c comparável à de mitocôndrias de hipocótilo. Com 24 horas de embebição da semente, as mitocôndrias de cotilédones mostraram atividade oxidativa e atividade fosforilante, não mais detectada com o aumento do tempo de embebição. As mitocôndrias de eixos embebidos com até 60 horas não apresentaram atividade fosforilante embora aumentasse a atividade oxidativa. Após este período é que começou o aparecimento da atividade fosforilante em mitocôndrias de eixo. Os resultados sugerem uma participação mitocondrial diferente no cotilédone e no eixo, bem como uma organização dos transportadores da cadeia respiratória que se modifica no curso da germinação.

AUXÍLIO FINANCEIRO DO CNPq.