

EFEITOS DA SALINIDADE NA ATIVIDADE DE ENZIMAS RESPONSÁVEIS PE
LA MOBILIZAÇÃO DE AMIDO DURANTE A GERMINAÇÃO DE VIGNA UNGUI-
CULATA (L.) WALP CV. PITIÚBA

MARIA ADÍLIA RAMOS DE CASTRO

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

FORTALEZA - 1982

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

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Maria Adília Ramos de Castro

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

17/12/1982

José Tarquínio Prisco
Orientador da Dissertação

Luiz Gonzaga Rebouças Ferreira

Renato de Azevedo Moreira

A meus pais,
irmãs
e
ao meu marido
e filhos

AGRADECIMENTOS

De modo especial, agradeço ao professor JOSÉ TARQUÍNIO PRISCO pela orientação prestada na execução deste trabalho.

Aos professores LUIZ GONZAGA REBOUÇAS FERREIRA e RENATO DE AZEVEDO MOREIRA, pelas importantes sugestões apresentadas durante a realização desta dissertação.

Meu agradecimento ao professor ENÉAS GOMES FILHO, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Agradeço ao professor ROBERTO CLÁUDIO FROTA BEZERRA, do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada, a contribuição na parte estatística desta dissertação.

Estendo meus agradecimentos aos demais docentes, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, responsáveis pelo ambiente de colaboração necessário ao bom desenvolvimento de qualquer trabalho científico.

Desejo estender os meus agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), e ao Convênio CNPq/FCPC/UFC - Dessalinização, pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço de modo especial, a meu esposo PEDRO HENRIQUE e a meus filhos DANIEL e TICIANA MARIA, que com compreensão e renúncia, contribuíram para a execução desta dissertação.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</u>	vii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	x
<u>ABREVIATURAS</u>	xi
<u>RESUMO</u>	xii
<u>ABSTRACT</u>	xiii
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 - <u>Conceito de Salinidade e suas Consequências na Agricultura</u>	1
1.2 - <u>O Processo Germinativo</u>	4
1.2.1 - Mudanças que Ocorrem na Fase I	4
1.2.2 - Mudanças que Ocorrem na Fase II	5
1.3 - <u>Efeitos da Salinidade na Germinação</u>	7
1.3.1 - Efeitos da Salinidade na Fase I	7
1.3.2 - Efeitos da Salinidade na Fase II	8
1.4 - <u>Objetivos do Presente Trabalho</u>	8
2 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	10
2.1 - <u>Sementes e Condições de Germinação</u>	10
2.2 - <u>Atividade Fosforilásica</u>	11
2.2.1 - Preparação dos Extratos	11
2.2.2 - Ensaio de Atividade	11
2.2.3 - Condições de Ensaio	13
2.2.4 - Determinação de Proteína	13
2.3 - <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</u>	14

	Página
3 - <u>RESULTADOS</u>	16
3.1 - <u>Salinidade e Desenvolvimento das Plântulas</u>	16
3.2 - <u>Atividade Fosforilásica</u>	18
3.2.1 - Condições de Ensaio	18
3.2.2 - Atividade Fosforilásica em Cotilédones	18
3.2.3 - Determinação de Proteína nos Extratos de Cotilédones	22
3.2.4 - Atividade Fosforilásica em Eixos Embrionários .	26
3.2.5 - Determinação de Proteína nos Extratos de Eixos Embrionários	30
3.3 - <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</u>	33
4 - <u>DISCUSSÃO</u>	43
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	50
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		Página
1	Desenvolvimento das plântulas do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp), oriundas de sementes que foram semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M	17
2	Variação da atividade fosforilásica de extrato de cotilédones de sementes quiescentes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) em função do pH	19
3	Características da atividade fosforilásica de extrato de cotilédones proveniente de sementes quiescentes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp)	20
4	Curva de atividade fosforilásica em função de quantidades crescentes de extrato de cotilédones proveniente de sementes quiescentes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp)	21
5	Atividade fosforilásica total de extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp), semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M	24
6	Atividade fosforilásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas	

	em água destilada e em solução de NaCl 0,1M	25
7	Concentração de proteína em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M	27
8	Atividade fosforilásica total de extratos de eixos embrionários de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M	29
9	Atividade fosforilásica específica de extratos de eixos embrionários provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M	31
10	Concentração de proteína em extratos de eixos embrionários provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M	32
11	Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de α -amilase em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada	34
12	Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de α -amilase em extratos de cotilédones proveni	

	entes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em NaCl 0,1M	36
13	Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de β -amilase em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M	37
14	Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de fosforilase em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada	38
15	Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de fosforilase em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em NaCl 0,1M	40
16	Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de proteínas em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada	41
17	Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de proteínas em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em NaCl 0,1M	42

LISTA DE TABELAS

TABELA

Página

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Atividade fosforilásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M | 23 |
| 2 | Atividade fosforilásica de extratos de eixos embrionários provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (<u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp) semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M | 28 |

ABREVIATURAS

- A_{660} - absorbância medida em 660nm
- EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
- P_i - fósforo inorgânico
- TCA - ácido tricloroacético

RESUMO

Quando sementes do feijão de corda pitiúba (Vigna unguiculata (L.) Walp) foram semeadas em água destilada e em NaCl 0,1M, observou-se que a salinidade retardou o crescimento e desenvolvimento das plântulas. Extratos de cotilédones e de eixos embrionários oriundos de plântulas provenientes de sementes semeadas nas condições acima citadas, foram utilizados para estudos de atividade fosforolítica durante a germinação. Para detecção de isoenzimas de fosforilase de α e β -amilase, ao longo do processo germinativo, usou-se extratos de cotilédones. A salinidade retardou o desenvolvimento da atividade fosforolítica, tanto em cotilédones como em eixos embrionários. Os resultados sugerem que este efeito deve-se a menor "solubilização" desta enzima no tratamento salino. A α -amilase pré-existe nas sementes quiescentes e sua atividade aumenta no decorrer do processo germinativo. Nos estudos de eletroforese para detecção de isoenzimas de α -amilase, observou-se o aparecimento de novas bandas de atividade α -amilolítica, sugerindo uma possível síntese de novo desta enzima ao longo da germinação. A β -amilase, que apresenta baixa atividade nas sementes quiescentes, depois de exercer sua função parece ser destruída. A atividade fosforilásica também pré-existe nas sementes quiescentes, mas não se pode afirmar que ela desaparece ao longo do processo germinativo. A salinidade não provocou o aparecimento de novas formas de fosforilases nem de amilases, no que diz respeito a mobilidade eletroforética. A presença do sal no meio de crescimento das plântulas parece provocar uma diminuição na síntese de novo de algumas isoenzimas com atividade α -amilásica.

ABSTRACT

When Vigna unguiculata (L.) Walp seeds were sown in distilled water and in 0.1M NaCl it was observed that salinity delayed seedling growth and development. Cotyledon and embryo-axis extracts from both treatments were used in the study of phosphorylase activity during germination. Salinity delayed phosphorylase activity in both cotyledons and embryo-axis. The results suggest that this effect was due to the lower "solubilization" of this enzyme in the salt treatment. In order to detect phosphorylase, α and β -amylase isoenzymes along the germination process cotyledon extracts were used. α -Amylase activity was detected in quiescent seeds, and it increased during germination. Electrophoresis studies for detection of α -amylase isoenzymes have shown the presence of new bands of activity during germination. This suggests the possible de novo synthesis of this enzyme along the germination process. β -amylase activity was low in quiescent seeds, and after exerting its function it was destroyed. Phosphorylase activity was also observed in quiescent seeds. However, it was not possible to confirm that it disappeared during germination. Salinity did not induce the appearance of new forms of amylases or phosphorylases isoenzymes during germination. The presence of NaCl in the seed and/or seedling environment appears to result in a decrease in de novo synthesis of α -amylase isoenzymes.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Conceito de Salinidade e suas Consequências na Agricultura

Um solo é considerado salino quando contém sais solúveis em quantidade suficiente para levar a uma diminuição no crescimento e na produção do vegetal. Os íons que contribuem para a salinidade do solo são, normalmente, cloreto, sulfato, carbonato, bicarbonato, sódio, cálcio, magnésio e raramente os íons nitrato e potássio (WAISEL, 1972; BERNSTEIN, 1975).

O excesso de sais no solo resulta de causas naturais ou provocadas pelo homem. Alguns solos, originados de "rochas salinas", contêm naturalmente sais suficientes para limitar a produção vegetal. Por outro lado, em solos não salinizados de zonas áridas, quando a água é removida por evapotranspiração, a concentração de sais nas camadas superficiais tende a aumentar, a menos que eles sejam retirados por lixiviação.

O emprego da irrigação com um sistema de drenagem deficiente pode acarretar uma elevação no nível do lençol freático e um conseqüente acúmulo de sais na zona arável do solo. Existem ainda situações em que o problema de salinidade resulta da utilização de águas de irrigação com elevado teor de sais. Estes fatos têm limitado seriamente a produtividade em solos de boa fertilidade e que originalmente não possuíam este problema (CARTER, 1975).

O excesso de sais no ambiente radicular reduz o crescimento da maioria das espécies vegetais, contudo, as plantas que vivem em solos salinizados (halófitas) não apenas toleram

a salinidade, mas seu crescimento pode até mesmo ser estimulado por ela (FLOWERS et al., 1977). Infelizmente, as plantas que são utilizadas pelo homem (espécies de importância econômica) são na sua quase totalidade suscetíveis à salinidade (glicófitas).

Segundo PRISCO (1980), existem duas alternativas para sobrevivência de uma planta quando ela é cultivada em solo salino: 1. a planta pode excluir os sais, evitando os perigos associados com o excesso de íons em suas células, mas correr o risco de sofrer "stress" hídrico; 2. a planta pode evitar o "stress" hídrico, através da absorção de íons existentes no solo, mas correr o risco de efeitos danosos do excesso de íons nas células.

Em geral, as halófitas excluem parte dos íons e absorvem outros. Além disso, elas produzem solutos orgânicos, de modo a que a redução no potencial osmótico de suas células seja devida não só a presença de íons inorgânicos, mas também a presença de solutos (FLOWERS et al., 1977), evitando assim o "stress" hídrico sem sofrer os efeitos danosos do excesso de íons em suas células.

No caso das glicófitas a situação é mais delicada porque o grau de tolerância a sais é altamente influenciado pelas condições ambientais - temperatura, umidade relativa do ar e tipo de solo - nas quais elas são cultivadas (BOYKO, 1966; PRISCO & O'LEARY, 1973; O'LEARY, 1975a, 1975b). Portanto, quando se tenta adaptar glicófitas à salinidade deve-se ter em mente duas alternativas: 1. modificações no ambiente em que as plantas são cultivadas; e 2. aumento da tolerância das culturas à salinidade.

No que diz respeito à primeira alternativa pode-se modificar o ambiente radicular e/ou o ambiente da parte aérea do vegetal. Uma técnica usada é a de manter o potencial hídrico do solo elevado a maior parte do tempo possível, o que pode ser

conseguido utilizando-se métodos de irrigação adequados. Outra técnica recomendada por BOYKO (1966), para irrigação com água salinizada é a do cultivo em solos arenosos. Segundo ele, plantas cultivadas nestes solos, toleram altos níveis de sais na água de irrigação porque possuem poros grandes e a água salina penetra com facilidade por eles, ficando em torno das partículas do solo só um delgado filme de solução. Como os poros do solo estão "saturados de umidade" as variações de temperatura possibilitarão a condensação de vapor na superfície das raízes muito finas e permitirão a absorção de água com baixo teor de sais. Outra técnica que envolve modificação do ambiente trata do cultivo de plantas em ambientes fechados que permitem a ocorrência de alta umidade relativa do ar. As plantas cultivadas nestas condições não sofrem tanto "stress" hídrico pois transpiram pouco (PRISCO, 1980).

No que diz respeito ao aumento da tolerância das culturas à salinidade, existem dois modos de tentar solucionar o problema. O primeiro seria compensar as desordens metabólicas causadas pela salinidade, através da aplicação de substâncias apropriadas (reguladores do crescimento) e o segundo seria utilizar, através de seleção ou melhoramento genético, cultivares mais resistentes à salinidade (PRISCO, 1980).

Como a salinidade afeta a síntese e/ou translocação de hormônios do sistema radicular para a parte aérea, onde eles atuam no metabolismo, a aplicação exógena de reguladores do crescimento, à parte aérea, deveria compensar as desordens metabólicas e conseqüentemente minorar a inibição do crescimento. Apesar de se ter conseguido algum sucesso inicial com aplicação de giberelinas e citocininas (O'LEARY & PRISCO, 1970b) os resultados posteriores não foram promissores (PRISCO & O'LEARY, 1973).

Para se conseguir algo positivo em termos de seleção ou melhoramento genético, precisa-se conhecer se existe suficiente variabilidade genética no que diz respeito a resistência

ou tolerância à salinidade, capaz de assegurar sucesso no melhoramento para essa característica. Além disso, precisa-se saber que características morfofisiológicas são necessárias para que uma planta se torne resistente ou tolerante a sais (PRISCO, 1980).

Em suma, todas as alternativas até então testadas para minorar os efeitos dos sais no crescimento das plantas não corresponderam ao esperado. Isto se deve, primordialmente, a falta de conhecimentos fundamentais sobre as mudanças fisiológicas que ocorrem, não só a nível de planta como a nível celular, quando um vegetal é cultivado em solos salinos.

1.2 - O Processo Germinativo

Quando uma semente é posta em um ambiente úmido, a água penetra no seu interior e como consequência ela aumenta de volume. Concomitantemente com este aumento em volume da semente, há um acréscimo da atividade metabólica em geral, especialmente da atividade respiratória e da síntese de proteínas. Como resultado disto, a semente germina, ou seja, a emergência da radícula ou de outra parte do embrião (BEWLEY & BLACK, 1978).

O processo germinativo pode ser dividido, segundo BEWLEY & BLACK (1978), em emergência da radícula (fase I) e estabelecimento da plântula (fase II). Do ponto de vista agrícola, a germinação só é considerada completa depois do estabelecimento de uma plântula normal (MACKAY, 1972).

1.2.1 - Mudanças que ocorrem na Fase I

A embebição de água pela semente ocorre igualmente bem em tecidos vivos ou mortos e é independente de sua atividade metabólica, embora o metabolismo comece rapidamente como uma

consequência desta hidratação. Os processos celulares que se iniciam após a hidratação da semente são: aumento do tamanho (volume) celular, aumento do número de células, maior diferenciação de mitocôndrias (que na semente seca se apresentam pobremente diferenciadas e ausentes de cristas), aumento da atividade respiratória (que se encontra em baixos níveis na semente seca). Verifica-se ainda, um aumento da síntese de DNA como parte indispensável da posterior síntese proteica, incremento na síntese de proteínas (que só ocorre quando a semente desidratada recebe água suficiente para que os ribossomos se associem com o RNA mensageiro) e aumento da síntese de membranas (BEWLEY & BLACK, 1978).

Nos estágios iniciais da germinação ocorre uma perda líquida de peso seco devido a oxidação de substâncias orgânicas. Uma vez que a germinação (emersão da radícula) tenha ocorrido, o crescimento da plântula continua, as custas da mobilização de reservas (BEWLEY & BLACK, 1978). O aumento do peso seco só se inicia quando a absorção de minerais pela raiz se torna conspícua e os cotilédones ou primeiras folhas adquirem a capacidade de fotossintetizar (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1963).

1.2.2 - Mudanças que ocorrem na Fase II

Após a emersão da radícula, inicia-se a hidrólise do material de reserva da semente, seguido do transporte deste material do órgão de reserva para o eixo embrionário e por último a síntese de novos materiais a partir dos produtos de hidrólise. Entre os materiais de reserva da semente, os mais importantes são proteínas, amido, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos, sendo os dois últimos primordialmente usados para a produção de energia (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1963).

Os cotilédones constituem o principal órgão de reserva das leguminosas não endospermicas, sendo o amido a reserva pre

ponderante (BEWLEY & BLACK, 1978). A mobilização de carboidratos foi estudada inicialmente em cereais (PALMIANO & JULIANO, 1972; SHOERAIN & WAGLE, 1976; OKAMOTO & OKAZAWA, 1980) e em algumas espécies de leguminosas (OOTA *et al.*, 1953; SWAIN & DEKKER, 1966; TÁRRAGO & NICÓLAS, 1976; ENÉAS FILHO, 1979). O amido pode existir na forma de amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear de unidades de D-glicose ligadas por ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina possui também ligações α -1,4, mas ocorrem ocasionalmente ramificações do tipo α -1,6.

Há dois caminhos para a "degradação" do amido: hidrolítico e fosforolítico. O caminho hidrolítico envolve as enzimas α -amilase e β -amilase. A amilose e a amilopectina podem ser atacadas pela α -amilase que hidrolisa ligações glicosídicas α -1,4 em pontos ao acaso ao longo da cadeia. Os produtos da degradação da amilose são glicose e maltose e da amilopectina, que também é atacada pela α -amilase, são glicose, maltose e dextrinas (pedaços de ramificações α -1,6 não hidrolizados pela α -amilase). Estas, por sua vez, são hidrolizadas pela ação de enzimas desramificantes. O amido também pode ser hidrolizado pela β -amilase. Esta enzima cliva a partir do final não redutor da molécula dando como produtos, maltose e "dextrina limite" (BEWLEY & BLACK, 1978).

No caminho fosforolítico a enzima envolvida é a fosforilase, que incorpora fosfato, através das ligações α -1,4 entre o penúltimo e o último resíduo de glicose da extremidade não redutora da cadeia polissacarídica, liberando uma molécula de glicose-1-fosfato. Os produtos de hidrólise acima mencionados são utilizados quer para produção de energia (tanto nos cotilédones como nos eixos embrionários) quer como matéria prima (esqueleto de carbono) para a síntese de estruturas mais complexas no eixo embrionário (BEWLEY & BLACK, 1978).

1.3. - Efeitos da Salinidade na Germinação

1.3.1 - Efeitos da Salinidade na Fase I

É conhecido há bastante tempo (BUFFUM, 1896; 1899) que a salinidade inibe a germinação de sementes. Para que haja emergência da radícula e estabelecimento da plântula é necessário que a embebição de água pela semente ocorra normalmente (BEWLEY & BLACK, 1978).

A absorção de água pelas sementes depende do gradiente de potencial hídrico no sistema ambiente externo-semente. O excesso de sais diminui o potencial hídrico do ambiente externo e a semente absorve menos água, acarretando assim uma alteração na cinética de embebição levando a uma menor velocidade e percentagem de germinação (STROGONOV, 1964; PRISCO & O'LEARY, 1970a). Esta sequência de eventos que ocorrem durante a germinação sob condições de salinidade foi proposta por Schimper em 1898 sob o nome de "teoria osmótica" (STROGONOV, 1964). Ela é motivo de controvérsia, pois quando uma mesma espécie é semeada em solos que possuem o mesmo potencial hídrico, mas diferente composição de sais, as sementes apresentam percentagens de germinação diferentes. Para explicar este fenômeno os pesquisadores americanos e soviéticos (BERNSTEIN, 1963; STROGONOV, 1964), propuseram a "teoria da toxicidade" dos sais, ou seja, a inibição da germinação é devida não a menor quantidade de água absorvida pelas sementes, mas à excessiva quantidade de íons que penetram nas sementes e irão afetar o metabolismo das mesmas, provocando como consequência a inibição da germinação. Hoje sabe-se que ambos os efeitos ocorrem simultaneamente (PRISCO & O'LEARY, 1970a).

Estes mesmos autores, mostraram que enquanto a salinidade praticamente não tem efeito sobre a fase I do processo germinativo, ela inibe drasticamente a fase II.

1.3.2 - Efeitos da Salinidade na Fase II

Para que o processo germinativo ocorra normalmente é necessário que haja hidrólise do material de reserva e transporte dos produtos de hidrólise para o eixo embrionário, a fim de que ele possa usá-los como fonte de "alimentos" para o seu crescimento (BEWLEY & BLACK, 1978).

Quando foi estudado o efeito da salinidade nas variações em peso seco de cotilédones e eixos embrionários na semente do feijão de corda pitiúba (GOMES FILHO & PRISCO, 1978), observou-se que para o caso de peso seco de cotilédones, tanto no tratamento controle como no tratamento salino, o peso seco caiu ao longo da germinação, sendo que no caso do tratamento controle houve uma queda bem mais acentuada que no tratamento salino, indicando que a salinidade inibe ou retarda a mobilização de reservas. Por sua vez, no caso de peso seco de eixos embrionários, tanto no tratamento controle como no tratamento salino, o peso seco cresceu ao longo da germinação, sendo que no tratamento controle o aumento foi bem mais acentuado do que no tratamento salino. Resultados semelhantes foram observados quando se estudou as variações em proteínas (PRISCO & VIEIRA, 1976; GOMES FILHO & PRISCO, 1978), ácidos nucleicos (VIEIRA, 1975) e carboidratos (ENÉAS FILHO, 1979) que são as principais reservas da semente de feijão.

1.4 - Objetivos do Presente Trabalho

De acordo com o que foi exposto, há uma possibilidade de que a inibição da germinação devido a salinidade seja através de seus efeitos na mobilização de reservas da semente. Como cerca de 57% das reservas do feijão de corda são constituídas de carboidratos (BRAGA, 1976), nada mais lógico do que se estudar os efeitos dos sais na mobilização destes compostos. Por

outro lado, há uma escassez evidente de publicações recentes sobre o assunto. No presente trabalho, pretende-se, usando cotilédones e eixos embrionários do feijão de corda pitiúba, estudar os efeitos do NaCl in vivo sobre a enzima fosforilase e detectar possíveis mudanças nas isoenzimas de fosforilase, α e β amilases envolvidas na mobilização de reservas de carboidratos, como uma contribuição para esclarecimento do efeito de salinidade na germinação.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Sementes e Condições de Germinação

No presente estudo foram utilizadas sementes do feijão de corda pitiúba (Vigna unguiculata (L.) Walp) provenientes da Fazenda Experimental do Vale do Curu, Pentecoste, Ceará, ou da Fazenda Lavoura Seca, Quixadá, Ceará.

As sementes foram selecionadas para germinação de acordo com a cor, tamanho e conformação, sendo excluídas sementes pequenas, escuras e mal conformadas. Após a seleção, elas foram submersas durante 10 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio, contendo 5,2% de cloro ativo (Brilux, Raymundo da Ponte Indústria S/A, Brasil), sendo excluídas as que se apresentaram "queimadas" após esse tratamento. Em seguida as sementes foram lavadas com bastante água destilada, a fim de retirar o excesso de cloro residual, e semeadas entre 2 folhas de papel de filtro de 30cm x 30cm (papel Mata Borrão Filtro, 80g/m², Companhia Fabricadora de Papel, Brasil), devidamente esterilizadas por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos e umedecidas com água destilada ou solução salina. Uma fileira de 10 sementes foi semeada a aproximadamente 2,5cm da borda superior do papel. Após a semeadura, 5 conjuntos de folhas de papel de filtro, contendo 10 sementes cada, foram enroladas e dispostas verticalmente dentro de depósitos de plástico de 1000ml, contendo cada depósito 20ml da mesma solução usada para umedecer o papel de filtro. Os depósitos de plástico, contendo os rolos de papel com as sementes, foram então colocados dentro de cubas de vidro e estas mantidas na obscuridade. A temperatura e a umidade relativa registradas no interior das cubas de vidro,

durante o período experimental, foram $25,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e 100%, respectivamente.

2.2 - Atividade Fosforilásica

Para as determinações de atividade fosforilásica foram colhidas plântulas nos dias 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 9 após a sementeira em água destilada ou em solução de NaCl 0,1M. Foram feitas três repetições, cada uma envolvendo de 20 a 45 cotilédones ou 15 a 340 eixos embrionários, dependendo do tamanho. Todas as determinações de atividade enzimática foram feitas em triplicata.

2.2.1 - Preparação dos Extratos

Os extratos de cotilédones ou eixos embrionários foram preparados segundo TÁRRAGO & NICÓLAS (1976), com algumas modificações. Em cada determinação o material foi homogeneizado durante 15 minutos em água destilada contendo EDTA 1mM (Merck S/A, Brasil) e 2-mercaptoetanol 5mM (Merck S/A, Brasil) na proporção de 1:20 (P:V). O homogenato foi centrifugado a $1000 \times g$ por 20 minutos a 4°C sendo o precipitado desprezado e o sobrenadante (extrato) utilizado para as determinações de atividade enzimática.

2.2.2 - Ensaio de Atividade

Os ensaios de atividade fosforilásica foram feitos pelo método de WHELAND (1955). A mistura de reação continha: 1ml de tampão citrato 0,05M (pH 6,0); 0,35ml de glicose-1-fosfato

0,1M (Sigma Chemical Company, EE.UU.); 0,15ml de amido solúvel 5% (Merck S/A, Brasil); 1ml do extrato (diluído quando necessário). Após incubação a 35°C por 10 minutos, a reação foi cessada pela adição de 5ml de TCA 5%. Para cada reação preparou-se uma prova em branco do ensaio, contendo todos os reagentes antes mencionados, sendo que, o extrato foi adicionado após cessada a reação com TCA 5%. Decorridos 30 minutos de repouso, à temperatura ambiente, a mistura de reação foi filtrada em papel filtro (Whatman 42) e uma alíquota de 1,5ml do filtrado foi utilizada para determinação de fósforo inorgânico (P_i), segundo o método de ALLEN (1940). Na preparação do molibdato ácido de amônio dissolveu-se 2,5g de molibdato de amônio (Mallinkrodt Chemical Works, EE.UU.) em 20ml de água destilada e em seguida adicionou-se 30ml de ácido sulfúrico 10N (Carlo Erba do Brasil S/A), completando-se o volume para 100ml com água destilada. O agente redutor foi preparado misturando-se 0,2g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico (Sigma Chemical Company, EE.UU.), 1,2g de bissulfito de sódio (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas Ltda, Brasil) e 1,2g de sulfito de sódio (Merck S/A, Brasil). Dissolveu-se, em seguida, 0,25g desta mistura em 10ml de água destilada.

Na determinação de P_i , adicionou-se a uma alíquota de 1,5ml do filtrado: 1ml de molibdato ácido de amônio 2,5%; 0,5ml do agente redutor e completou-se o volume para 10ml com água destilada. Após incubação desta mistura à temperatura ambiente, por 15 minutos, mediu-se a absorvância em 660nm (A_{660}) em um espectrofotômetro Spekol (JENA, República Democrática Alemã) contra uma prova em branco constituída de: 1ml de molibdato ácido de amônio 2,5%, 0,1ml de agente redutor e 8,9ml de água destilada. Dos valores de absorvância obtidos para as amostras subtraiu-se os da prova em branco. Estas diferenças em absorvância foram multiplicadas pelos fatores de diluição e pelos volumes dos extratos, sendo este produto dividido pelo número de cotilédones ou eixos embrionários utilizados na preparação dos extratos e pelo tempo de incubação a 35°C. A atividade fosforilásica total foi expressa em ΔA_{660} por cotilédone ou eixo

embrionário por hora. A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade total pela concentração de proteína por cotilédone ou eixo embrionário.

2.2.3 - Condições de Ensaio

A determinação do pH ótimo de atividade fosforilásica efetuou-se utilizando-se tampão citrato 0,1M nos seguintes pHs: 4,0; 4,4; 4,8; 5,2; 5,6; 6,0; 6,2; 6,4; e 6,8 e tampão Tris-HCl 0,5M, nos seguintes pHs: 7,0; 7,4; 7,8; e 8,2. Os extratos utilizados foram de cotilédones provenientes de sementes quiescentes.

Para a escolha da concentração de substrato e de enzima (extrato), a ser usada foram feitos 3 experimentos, com extratos de cotilédones de sementes quiescentes. No primeiro, a concentração de amido variou, conservando-se constante a concentração de glicose-1-fosfato e o volume do extrato. No segundo, a concentração de glicose-1-fosfato variou, conservando-se constante a concentração de amido e o volume do extrato. No terceiro, foram mantidas constantes a concentração de amido e de glicose-1-fosfato, variando-se o volume do extrato.

2.2.4 - Determinação de Proteína

Para a determinação da concentração de proteína utilizou-se o método do microbiureto descrito por GOA (1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina, cristalizada e liofilizada (Sigma Chemical Company, EE.UU.).

2.3 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Para os experimentos de eletroforese foram colhidas plântulas nos dias 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 9 após a semeadura em água destilada ou em solução de NaCl 0,1M. Nestes experimentos o extrato foi preparado segundo TÁRRAGO & NICÓLAS (1976), com algumas modificações. Para cada determinação, 20 a 45 cotilédones dependendo do tamanho, foram homogeneizados durante 1 hora em água destilada numa proporção de 1:10 (P:V). O homogenato foi centrifugado a 1000 x g por 20 minutos a 4°C, sendo o precipitado desprezado e o sobrenadante (extrato) utilizado para os experimentos de eletroforese com revelação para isoenzimas de fosforilase, α e β -amilases e proteínas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo o método CLARKE (1964). Foram usados tubos de vidro de 7 x 75mm contendo 1,2ml de gel, sendo o tampão de corrida Tris-Glicina-HCl pH 8,1. Aliquotas de 50 μ l do extrato, contendo sacarose numa concentração final de 10%, foram aplicadas ao topo da coluna de gel e a eletroforese desenvolvida a uma corrente de 1 mA/tubo durante aproximadamente 1 hora, à temperatura ambiente.

Para os experimentos de eletroforese das proteínas foram usados extratos contendo 3mg de proteínas por mililitro. Para a localização das bandas, após a corrida, os géis foram tratados com negro de amido 1% em metanol: ácido acético: água (5:4:1), durante 1 hora e o excesso de corante foi retirado com ácido acético 7%.

Para os experimentos de eletroforese com revelação para isoenzimas de α -amilase, aos extratos contendo 3mg de proteínas por mililitro foi adicionado CaCl₂ (Merck S/A, Brasil) na concentração final de 3mM. Este extrato contendo CaCl₂ foi deixado em repouso por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida foi colocado em um banho-maria a 70°C, por 15 minutos,

com a finalidade de inativar a β -amilase (TÁRRAGO & NICÓLAS, 1976). Após esse tratamento, o extrato foi centrifugado a temperatura ambiente em uma centrífuga clínica (Fanem, Brasil), a 1300 x g, durante 15 minutos. Para a localização das bandas de atividade, após a corrida, os géis foram imersos em uma solução de amido 1% em tampão acetato 0,1M, pH 6,0 e incubados a 30°C por 150 minutos. Em seguida foram lavados com água destilada e mergulhados em uma solução de iodo-iodeto de potássio acidificada com HCl 0,05N (preparada momentos antes) por 10 minutos. A solução "estoque" de iodo-iodeto de potássio foi preparada dissolvendo-se em água destilada 6,0g de iodeto de potássio (E. Merck AG, República Federal da Alemanha) e 600mg de iodo (E. Merck AG, República Federal da Alemanha), completando-se em seguida o volume da solução para 100ml com água destilada.

Nos experimentos de eletroforese com revelação para isoenzimas de β -amilase, as amostras continham uma concentração variada de proteínas (8 a 14mg de proteínas por mililitro), dependendo do estágio de germinação. Para a localização das bandas de atividade, os géis foram colocados em solução de amido 1% em tampão acetato 0,1M, pH 6,0 e incubados a 30°C por 150 minutos. Em seguida, foram lavados com água destilada e mergulhados por 10 minutos em uma solução de iodo-iodeto de potássio acidificada com HCl 0,05N (preparada momentos antes).

Para os experimentos de eletroforese com revelação para isoenzimas de fosforilase, foram usados extratos contendo 3mg de proteínas por mililitro. Para a localização das bandas de atividade, os géis foram colocados em solução de amido 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 6,0 e incubados a 30°C por 150 minutos. Em seguida, foram lavados com água destilada e submersos durante 10 minutos em uma solução de iodo-iodeto de potássio acidificada com HCl 0,05N (preparada momentos antes).

Os géis após serem colocados em solução de iodo-iodeto de potássio, apresentaram uma coloração azul, exceto nas zonas onde havia atividade fosforilásica e α e β -amilásicas.

3 - RESULTADOS

3.1 - Salinidade e Desenvolvimento das Plântulas

A FIGURA 1 demonstra claramente que a salinidade retarda o desenvolvimento das plântulas. Tanto no tratamento controle (sementes semadas em água destilada) como no salino (sementes semadas em NaCl 0,1M) não houve emergência de radículas no 1º dia após a semeadura. No 2º dia, o comprimento médio das radículas foi de 2cm no tratamento controle e de 1cm no tratamento salino, enquanto que no 3º dia as radículas do tratamento controle apresentaram um comprimento médio de 6cm e nas do tratamento salino este valor foi de 3cm. A partir do 5º dia as plântulas do tratamento controle apresentavam-se bem desenvolvidas, identificando-se facilmente raiz (12cm), hipocótilo (10cm) e epicótilo (3cm), enquanto que nas do tratamento salino a diferenciação da plântula só foi visível no 9º dia após a semeadura. No último dia do período experimental, o comprimento total médio das plântulas foi de 38cm (raiz, 18cm; hipocótilo, 10cm; epicótilo, 10cm) para o tratamento controle e 14cm (raiz, 6cm; hipocótilo, 6cm; epicótilo, 2cm) para o tratamento salino. Convém salientar que a salinidade inibiu a germinação em cerca de 50% do valor encontrado para o controle e que os valores de comprimento total médio acima mencionados foram calculados a partir de medições feitas em plântulas que apresentavam radículas com pelo menos 5cm.

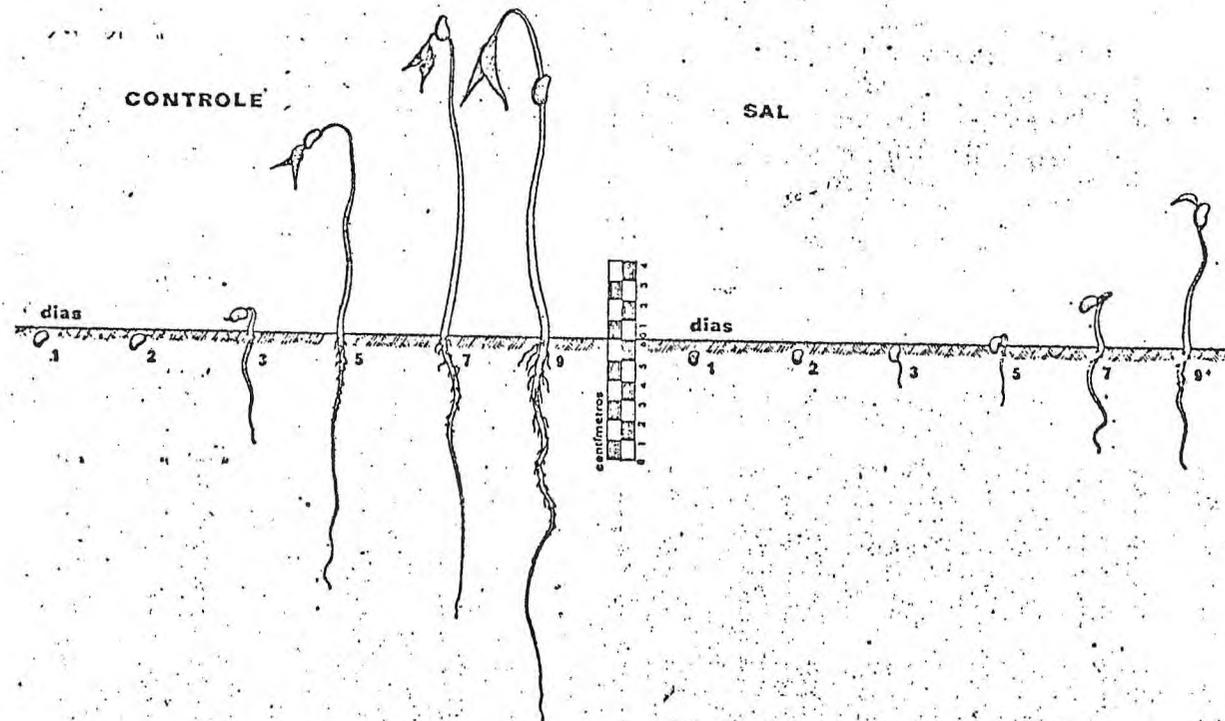


FIGURA 1 - Desenvolvimento das plântulas do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), oriundas de sementes que foram semeadas em água destilada (controle) e em solução de NaCl 0,1M (Sal).

3.2 - Atividade Fosforilásica

3.2.1 - Condições de Ensaio

O estudo da atividade fosforilásica durante a germinação foi precedido da determinação das condições ótimas de ensaio, em extratos obtidos de cotilédones provenientes de sementes quiescentes do feijão de corda pitiúba. Na faixa de pH estudada, a atividade fosforilásica aumentou desde pH 4,8 até 5,6, permanecendo constante na faixa de pH entre 5,6 e 6,0, quando começou a decrescer até pH 8,2 (FIGURA 2). O pH 6,0 foi escolhido como pH de ensaio para esta atividade. Para que a reação enzimática se processasse em excesso de substrato, determinou-se o efeito da concentração dos substratos na atividade da enzima (FIGURA 3). A partir dos dados obtidos, foram escolhidas as relações "enzima-substrato" de 7,5mg de amido para 1,0ml de extrato, diluído 1:10 com tampão citrato 0,05M pH 6,0, sendo o volume final da reação de 2,5ml (FIGURA 3A) e de 11,7mg de glicose-1-fosfato para 1,0ml de extrato diluído 1:10 com tampão citrato 0,05M pH 6,0, sendo o volume final da reação de 2,5ml (FIGURA 3B). O efeito da concentração da enzima na atividade enzimática foi determinado (FIGURA 4). A atividade aumentou em função das quantidades crescentes de extrato (enzima bruta), diluído 1:10 com tampão citrato 0,05M pH 6,0 na mistura de reação, havendo linearidade até o valor de $\Delta A_{660} \times h^{-1}$ menores ou iguais a 0,265.

3.2.2 - Atividade Fosforilásica em Cotilédones

Nos experimentos realizados ao longo do processo germinativo, encontrou-se que a atividade fosforilásica total (TABELA

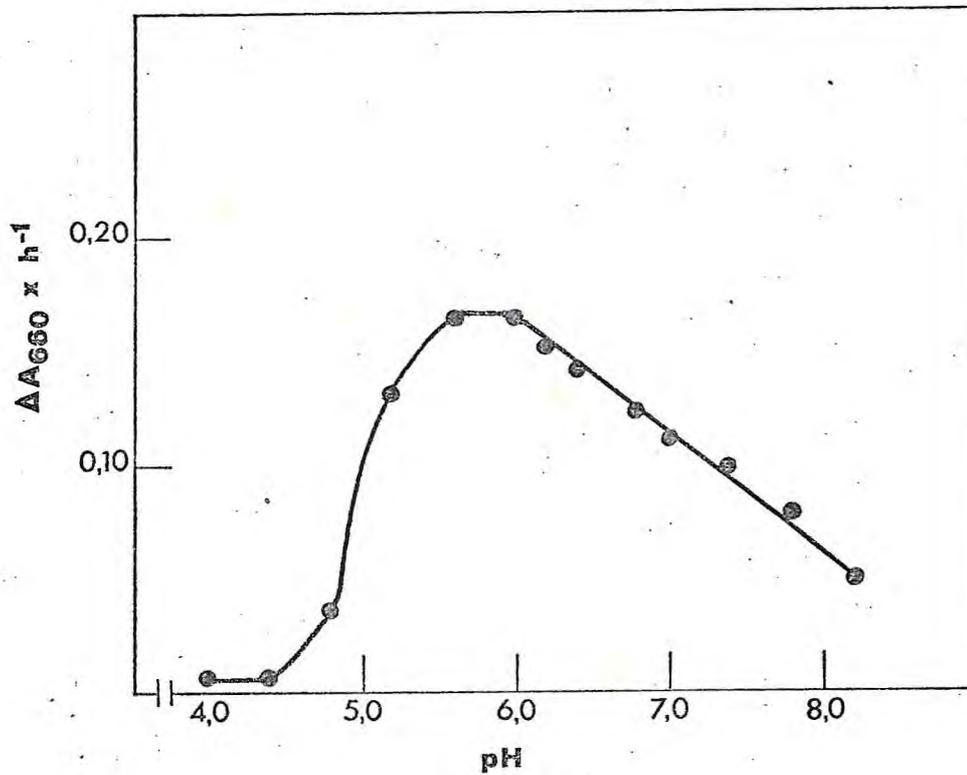


FIGURA 2 - Variação da atividade fosforilásica de extrato de cotilédones provenientes de sementes quiescentes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) em função do pH. Volume final da reação: 2,5ml.

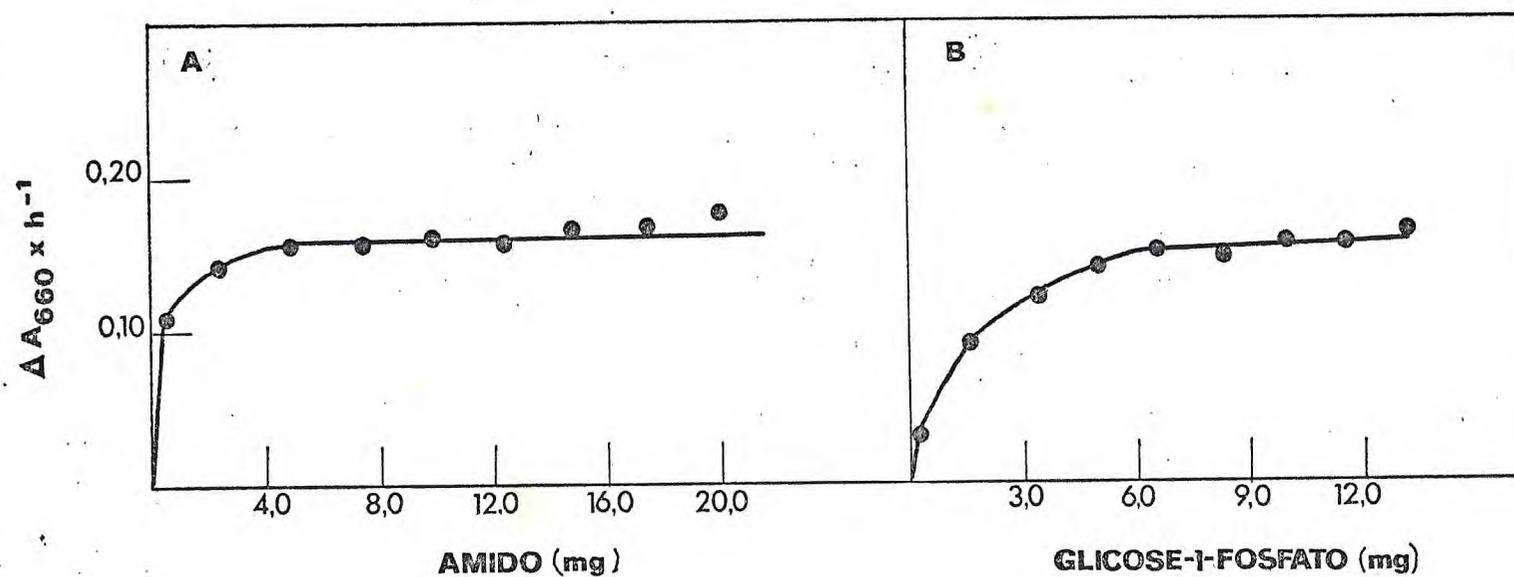


FIGURA 3 - Características da atividade fosforilásica de extrato de cotilédones proveniente de sementes quiescentes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). A: curva de atividade de fosforilásica em função de quantidades crescentes de amido; B: curva de atividade fosforilásica em função de quantidades crescentes de glicose-1-fosfato. O extrato original foi diluído em ambos os casos 1:10 com tampão citrato 0,05M, pH 6,0 e o volume final da reação foi de 2,5ml.

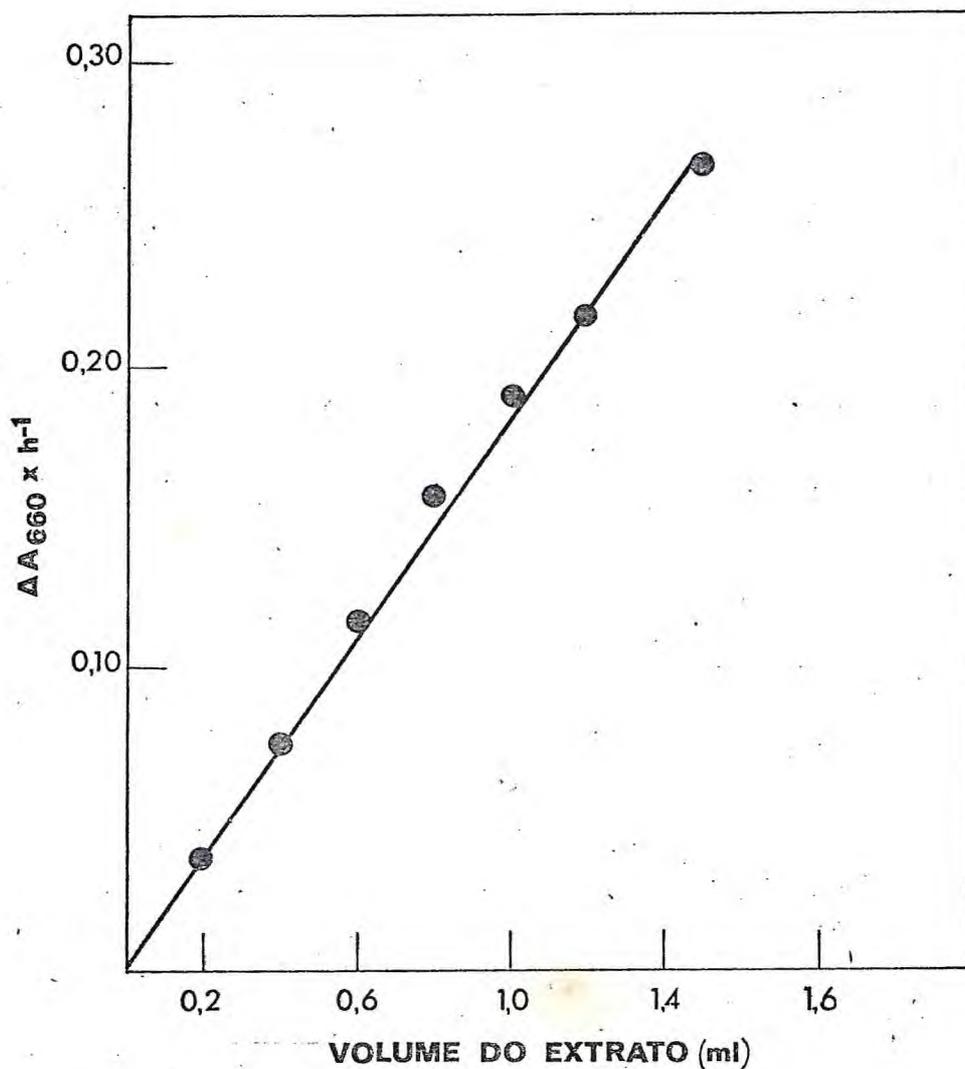


FIGURA 4 - Curva de atividade fosforilásica em função de quantidades crescentes de extrato de cotilédones proveniente de sementes quiescentes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata*(L.) Walp). Extrato diluído 1:10 com tampão citrato 0,05M, pH 6,0 e o volume final da reação foi de 2,5ml.

LA 1, FIGURA 5) nos cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba que foram semeadas em água destilada cresceu entre o dia zero e o 1º dia após a semeadura, quando começou a decrescer até o 7º dia. A atividade fosforilásica total nos cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba que foram semeadas em solução de NaCl 0,1M, cresceu entre o dia zero e o 1º dia, permaneceu constante até o 2º dia após a semeadura, decrescendo, daí, até o final do experimento. A análise estatística mostrou que houve diferença entre as atividades totais nos dois tratamentos, somente no 1º e no 3º dias após a semeadura, ou seja, no 1º dia a atividade total medida no controle foi superior àquela do tratamento salino, enquanto que no 3º dia ocorreu o inverso, isto é, a atividade total do controle foi inferior a do tratamento salino. No último dia do experimento os valores de atividade fosforilásica total encontrados em extratos de cotilédones provenientes dos dois tratamentos controle e salino representaram, respectivamente, 0,8% e 8,5% daqueles encontrados no dia zero.

A atividade fosforilásica específica de extratos de cotilédones oriundos de plântulas dos dois tratamentos apresentou-se aproximadamente constante até o 3º dia, quando começou a decrescer até o 7º dia (TABELA 1, FIGURA 6). Nesta ocasião, a atividade fosforilásica específica representou, respectivamente, para o tratamento controle e para o tratamento salino, 3,2% e 20,0% do valor encontrado no dia zero. A análise estatística mostrou que havia diferença entre as atividades específicas nos dois tratamentos somente no 7º dia após a semeadura, quando a atividade medida no controle foi 6,3 vezes inferior àquela do tratamento salino.

3.2.3 - Determinação de Proteína nos Extratos de Cotilédones

Dos extratos utilizados para os ensaios de atividade

TABELA 1 - Atividade fosforilásica de extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (Vigna unguiculata (L.) Walp) semeadas em água destilada (C) e em solução de NaCl 0,1M (S).

Dias após a semeadura	Atividade total ⁽¹⁾		Atividade específica ⁽¹⁾	
	$(\Delta A_{660} \times \cot^{-1} \times h^{-1})$		$(\Delta A_{660} \times \text{mg Prot}^{-1} \times h^{-1})$	
	C	S	C	S
0	<u>13,00</u>	<u>13,00</u>	<u>0,95</u>	<u>0,95</u>
1	<u>18,50</u>	<u>14,50</u>	<u>1,00</u>	<u>0,92</u>
2	<u>14,50</u>	<u>14,50</u>	<u>0,87</u>	<u>0,86</u>
3	<u>7,20</u>	<u>12,50</u>	<u>0,89</u>	<u>0,95</u>
5	<u>1,90</u>	<u>2,90</u>	<u>0,40</u>	<u>0,40</u>
7	<u>0,11</u>	<u>1,10</u>	<u>0,03</u>	<u>0,19</u>

(1) Dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%. Os valores acima são médias de 3 repetições, tendo sido efetuadas 3 leituras de ΔA_{660} para cada repetição.

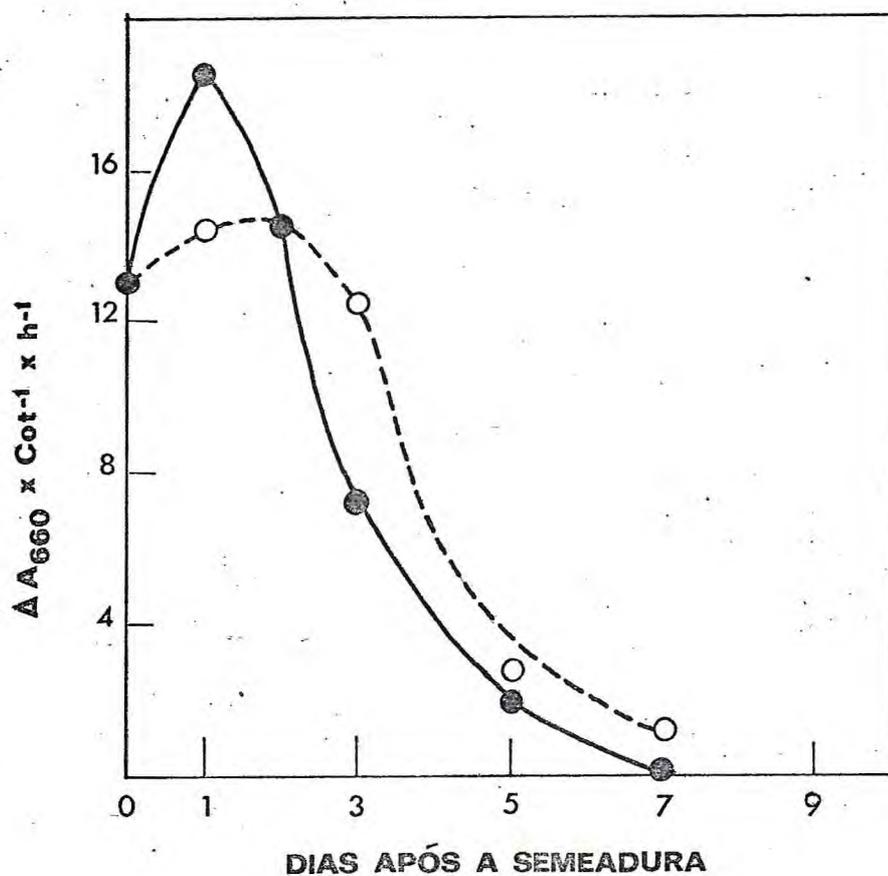


FIGURA 5 - Atividade fosforilásica total de extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pituba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1M (○—○)

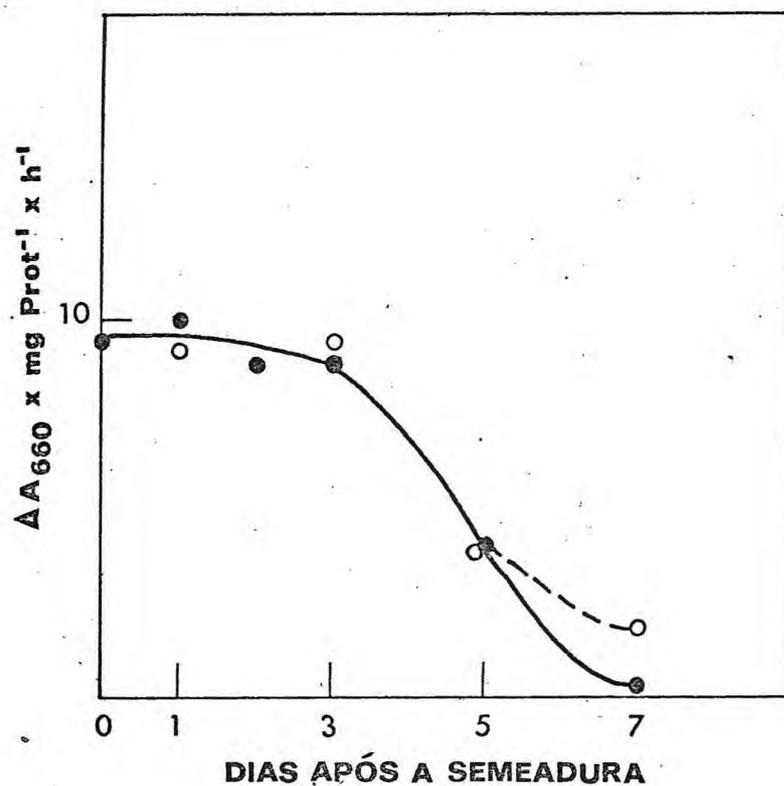


FIGURA 6 - Atividade fosforilásica específica de extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1M (○—○).

fosforilásica foram retiradas amostras e feitas determinações de proteína (FIGURA 7). A concentração de proteínas nos extratos de cotilédones oriundos de plântulas provenientes de sementes semeadas em água destilada cresceu até o 1º dia após a semeadura, quando começou a decrescer, chegando no 7º dia a atingir 26,2% do valor apresentado no dia zero. Nos extratos de cotilédones provenientes do tratamento salino este valor aumentou até o 2º dia após a semeadura, decrescendo até o final do experimento quando atingiu 40,1% do valor apresentado para o dia zero. Os valores de concentração de proteína no tratamento controle foram maiores que os do tratamento salino até o 1º dia após a semeadura, iguais em ambos os tratamentos no 2º dia, e daí em diante os do tratamento salino foram sempre maiores que os do controle.

3.2.4 - Atividade Fosforilásica em Eixos Embrionários

O estudo da atividade fosforilásica durante a germinação, foi também efetuado em extratos de eixos embrionários provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba, que foram semeadas em água destilada e em solução salina.

Nos experimentos realizados ao longo do processo germinativo, encontrou-se que a atividade fosforilásica total (TABELA 2, FIGURA 8) em extratos de eixos embrionários provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba que foram semeadas em água destilada cresceu entre o dia zero e o 5º dia após a semeadura, decrescendo daí até o 9º dia quando seu valor foi cerca de 310% daquele apresentado no dia zero. A atividade fosforilásica total (TABELA 2, FIGURA 8) nos extratos de eixos embrionários provenientes de sementes do feijão semeadas em solução de NaCl 0,1M, cresceu entre o dia zero e o 7º dia após a semeadura, decrescendo até o final do experimento, quando atingiu um valor em torno de 474% daquele apresentado no dia zero. A aná

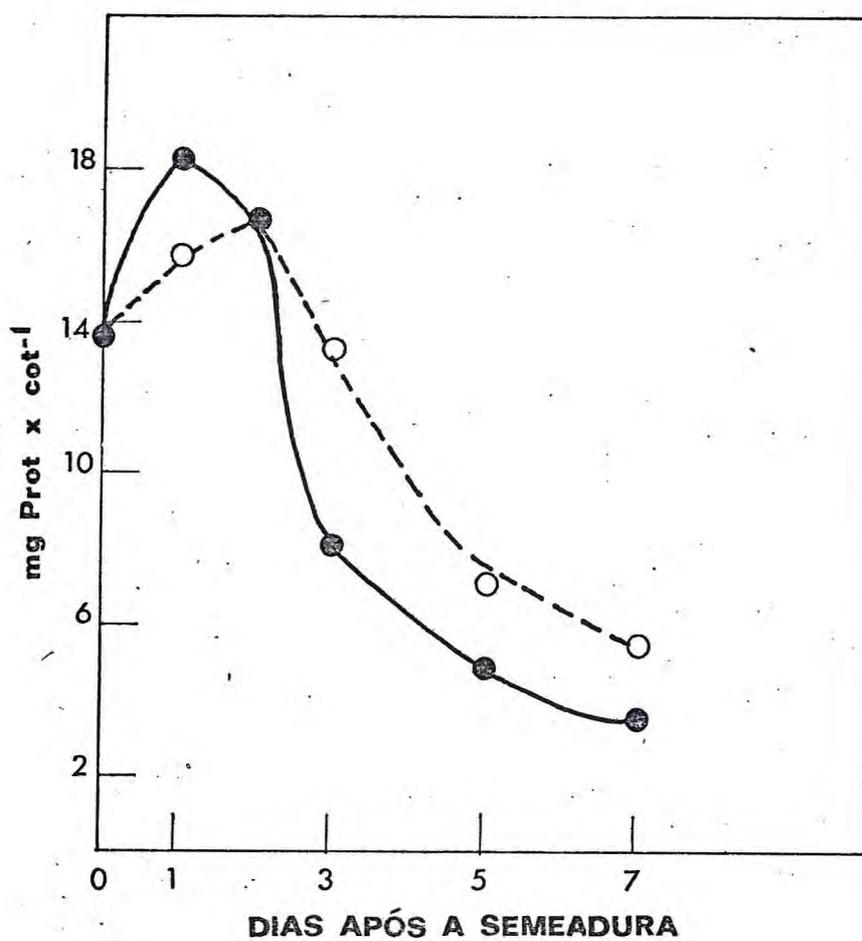


FIGURA 7 - Concentração de proteína em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata*(L.) Walp) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1M(o—o)

TABELA 2 - Atividade fosforilásica de extratos de eixos embrionários provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (Vigna unguiculata (L.) Walp) semeadas em água destilada (C) e em solução de NaCl 0,1M (S).

Dias após a semeadura	Atividade total ⁽¹⁾ ($\Delta A_{660} \times \text{eixo}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)		Atividade específica ⁽¹⁾ ($\Delta A_{660} \times \text{mg Prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)	
	C	S	C	S
	0	<u>0,213</u>	<u>0,213</u>	<u>0,200</u>
1	<u>0,370</u>	<u>0,320</u>	<u>0,250</u>	<u>0,255</u>
2	<u>0,419</u>	<u>0,320</u>	<u>0,166</u>	<u>0,174</u>
3	<u>0,860</u>	<u>0,440</u>	<u>0,089</u>	<u>0,146</u>
5	<u>1,840</u>	<u>0,910</u>	<u>0,079</u>	<u>0,100</u>
7	<u>1,580</u>	<u>1,310</u>	<u>0,060</u>	<u>0,077</u>
9	<u>0,660</u>	<u>1,010</u>	<u>0,026</u>	<u>0,043</u>

(1) Os dois valores sublinhados não são estatisticamente diferentes ao nível de 5%. Os valores acima são médias de 3 repetições, tendo sido efetuadas 3 leituras de ΔA_{660} para cada repetição.

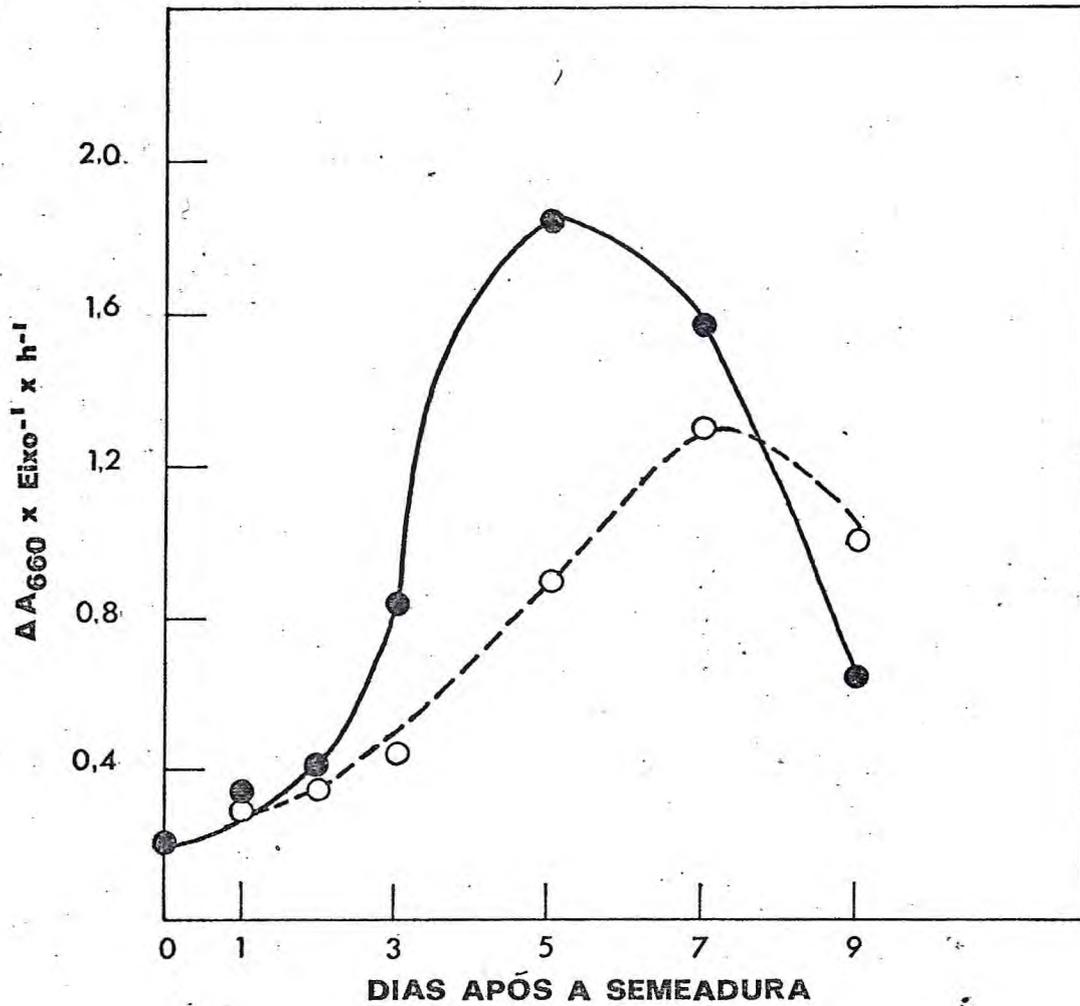


FIGURA 8 - Atividade fosforilásica total de extratos de eixos embrionários de sementes do feijão de corda pitibá (*Vigna unguiculata*(L.) Walp) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1M(o—o)

lise estatística mostrou que até o 2º dia após a sementeira, os valores de atividades totais nos eixos embrionários dos tratamentos controle e salino não diferiram. Do 3º ao 9º dia após a sementeira as atividades fosforilásicas totais do controle mostraram-se sempre superiores às do tratamento salino. No último dia do experimento, o valor da atividade fosforilásica total do tratamento salino foi 1,5 vezes superior àquele do tratamento controle.

A atividade fosforilásica específica de extratos de eixos embrionários oriundos de plântulas semeadas em água destilada, apresentou-se crescente até o 1º dia após a sementeira, quando decresceu até o 9º dia (TABELA 2, FIGURA 9). Nesta ocasião o valor encontrado representou 13% daquele observado no dia zero. A atividade específica de eixos embrionários provenientes do tratamento salino também cresceu até o 1º dia após a sementeira, decrescendo em seguida até o final do experimento. No 9º dia após a sementeira, a atividade fosforilásica específica em eixos embrionários oriundos do tratamento salino representou cerca de 22% daquele encontrado no dia zero. A análise estatística mostrou que houve diferença entre as atividades específicas dos dois tratamentos somente no 3º dia após a sementeira, onde a atividade específica no tratamento salino foi superior à do tratamento controle.

3.2.5 - Determinação de Proteína nos Extratos de Eixos Embrionários

Dos extratos utilizados para os ensaios de atividade fosforilásica, foram retiradas amostras e feitas determinações de proteína (FIGURA 10). A concentração de proteína nos extratos de eixos embrionários, oriundos de plântulas provenientes de sementes semeadas em água destilada, apresentou-se constan

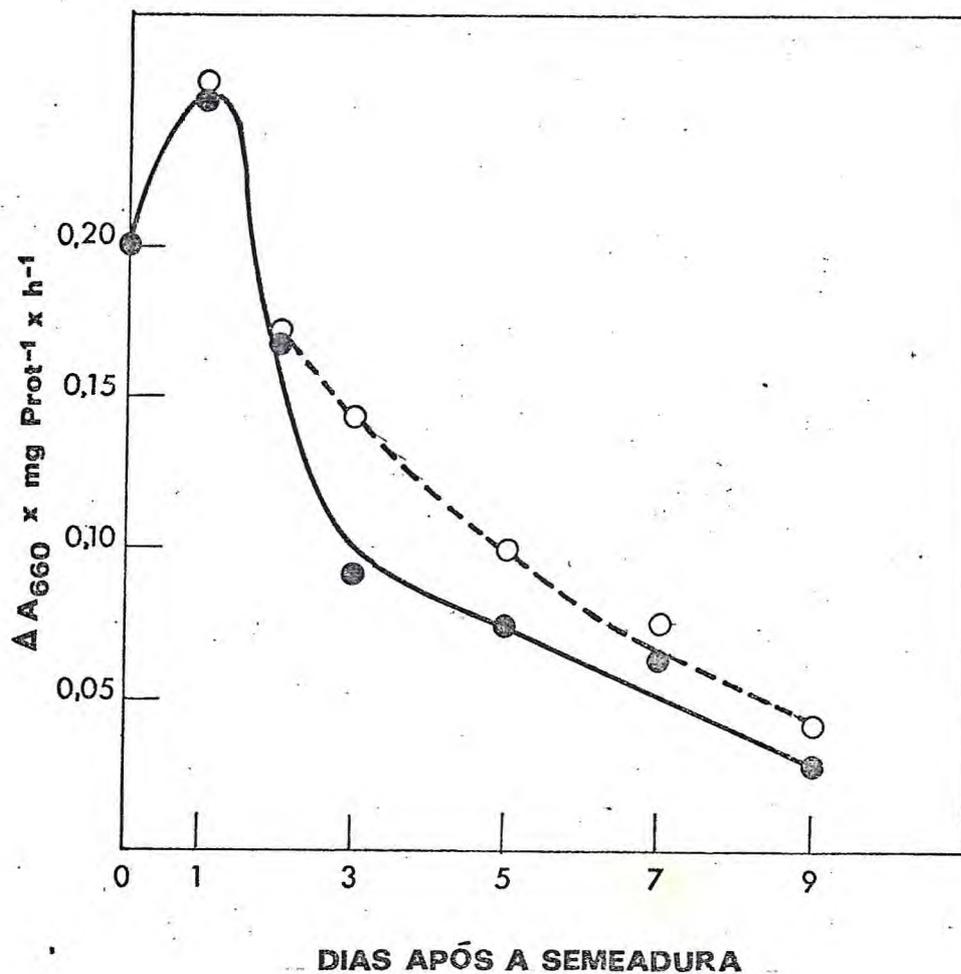


FIGURA 9 - Atividade fosforilásica de extratos de eixos em brionários provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1M (○—○)

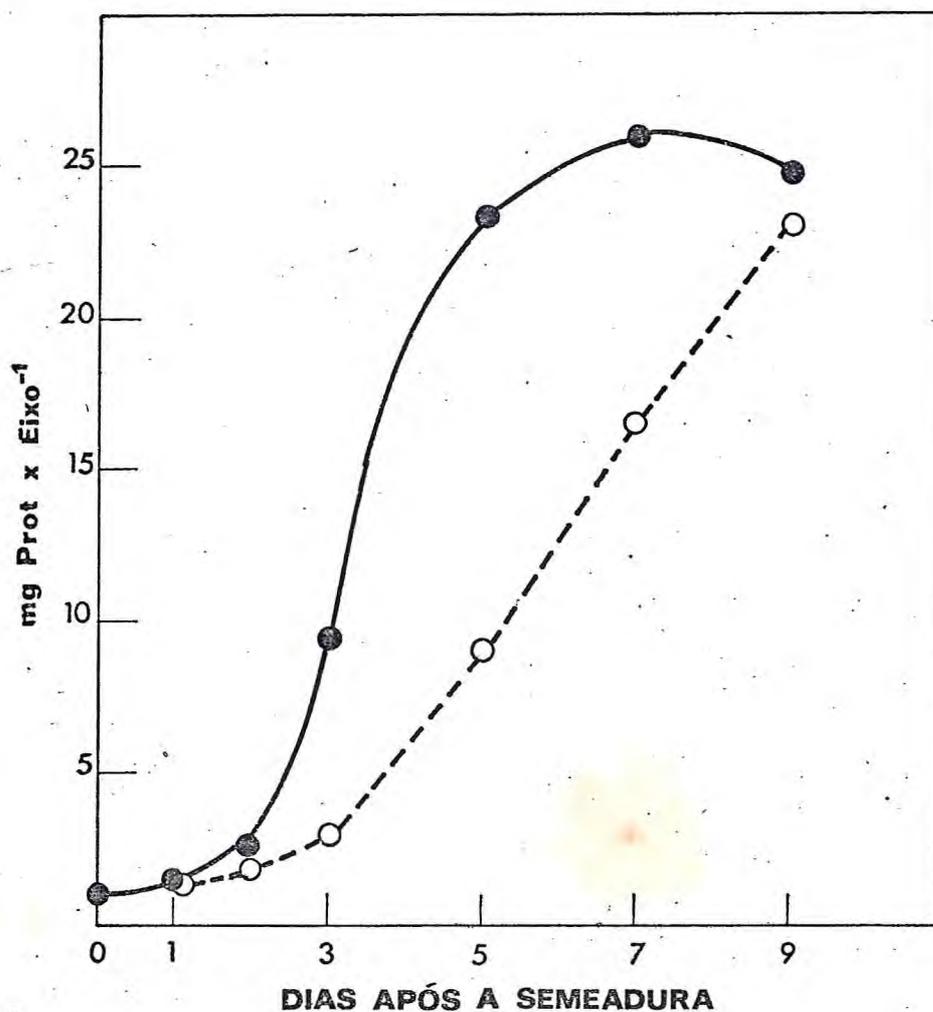


FIGURA 10 - Concentração de proteína em extratos de eixos em brionários provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata*(L.) Walp) semeadas em água destilada (●—●) e em solução de NaCl 0,1M (○—○)

te até o 1º dia após a sementeira, aumentando a partir daí, até o 7º dia, quando sofreu um pequeno decréscimo até o final do experimento. Nesta ocasião o valor encontrado representa 2332% daquele apresentado no dia zero. Nos extratos de eixos embriônicos provenientes do tratamento salino a concentração de proteína apresentou-se constante até o 1º dia após a sementeira, quando atingiu 2182% do valor encontrado no dia zero. Durante o processo germinativo os valores de proteína do dia zero até o 2º dia foram iguais para os dois tratamentos, a partir daí os valores de concentração de proteína foram sempre maiores no tratamento controle.

3.3 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida foram efetuados em extratos de cotilédones de plântulas do feijão de corda pitiúba sementeiras em água destilada ou em solução de NaCl 0,1M com revelação para isoenzimas de fosforilase e de α e β amilases.

Na detecção de isoenzimas de α -amilase em extratos de sementes provenientes do tratamento controle (FIGURA 11), foram encontradas três bandas (a, b, c) nos dias 0, 1, 2 e 3, enquanto que nos dias 5, 7 e 9 após a sementeira foram encontradas quatro bandas (a, b, c, d). Estas bandas se caracterizaram por serem incolores, apresentarem baixa velocidade de migração, serem resistentes ao aquecimento em banho-maria à 70°C por 15 minutos na presença de CaCl_2 3mM e se mostrarem ativas quando os géis foram incubados em amido 1% em tampão fosfato 0,1M pH 6,0 ou tampão acetato 0,1M pH 6,0. Estes quatro grupos de isoenzimas de α -amilase apresentaram os seguintes valores médios de R_f : 0,29 (banda a); 0,36 (banda b); 0,42 (banda c) e 0,47 (banda d).

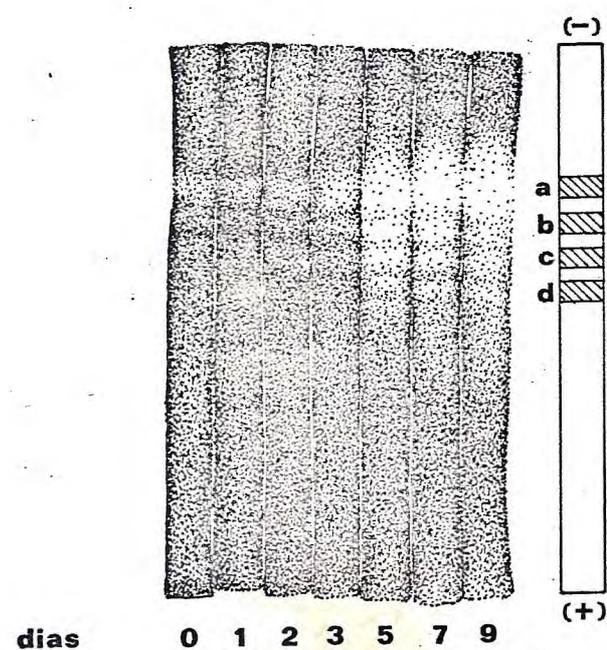


FIGURA 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de α -amilase em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) semeadas em água destilada. Os extratos continham 3mg de proteínas por mililitro e os números representam os dias ao longo do processo germinativo em que foram preparados os extratos.

Nos experimentos para detecção de isoenzimas de α -amylase no tratamento salino, foi encontrada uma banda (a) nos dias 0, 1, 2 e 3 e quatro bandas (a, b, c, d) nos dias 5, 7 e 9 após a semeadura (FIGURA 12). Estas bandas tiveram comportamento semelhante às do tratamento controle e seus valores médios de R_f foram: 0,29 (banda a); 0,37 (banda b); 0,43 (banda c) e 0,47 (banda d).

Nos experimentos para detecção de isoenzimas de β -amylase, tanto no controle como no tratamento salino, não se conseguiu detectar a existência de nenhuma isoenzima, quando os extratos continham 3mg de proteína por mililitro. Todavia, usando-se extratos mais concentrados (8 a 14mg de proteína por mililitro) foram encontradas, para o tratamento controle, três bandas (f, g, h) nos dias 0, 1 e 2 após a semeadura, enquanto que nos outros dias elas estiveram ausentes (FIGURA 13). Estas bandas se caracterizaram por terem cor rosa-claro, apresentarem grande velocidade de migração, serem sensíveis ao aquecimento a 70°C por 15 minutos mesmo da presença de CaCl_2 3mM e se mostram ativas quando os géis foram incubados em amido 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 6,0 ou tampão acetato 0,1M, pH 6,0. Estes três grupos de isoenzimas de β -amilase apresentaram os seguintes valores médios de R_f : 0,66 (banda f); 0,75 (banda g) e 0,80 (banda h).

Nos experimentos para detecção de isoenzimas de β -amylase no tratamento salino, foram encontradas três bandas (f, g, h) nos dias 0, 1, 2 e 3 após a semeadura, estando ausente nos outros dias (FIGURA 13). Estas bandas tiveram características e comportamento semelhantes àqueles do tratamento controle e seus valores médios de R_f foram: 0,63 (banda f); 0,70 (banda g) e 0,76 (banda h).

Nos experimentos para detecção de isoenzimas de fosforilase em extratos de sementes provenientes do tratamento controle apenas uma banda (e) foi encontrada (FIGURA 14). Esta banda se caracterizou por ser incolor, apresentar velocidade de migra

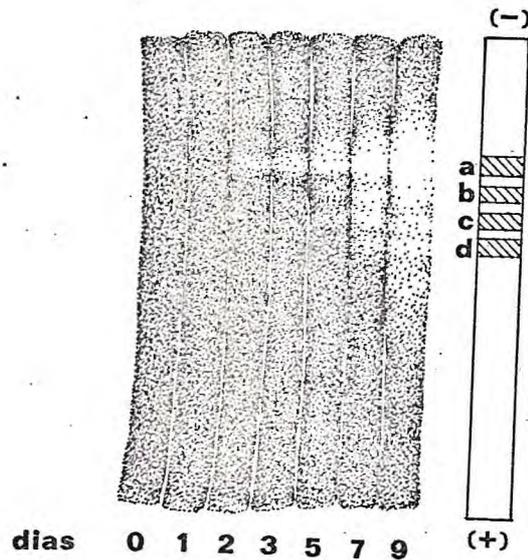


FIGURA 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de α -amilase em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) semeadas em solução de NaCl 0,1M. Os extratos contêm 3mg de proteínas por mililitro e os números representam os dias ao longo do processo germinativo em que foram preparados os extratos.

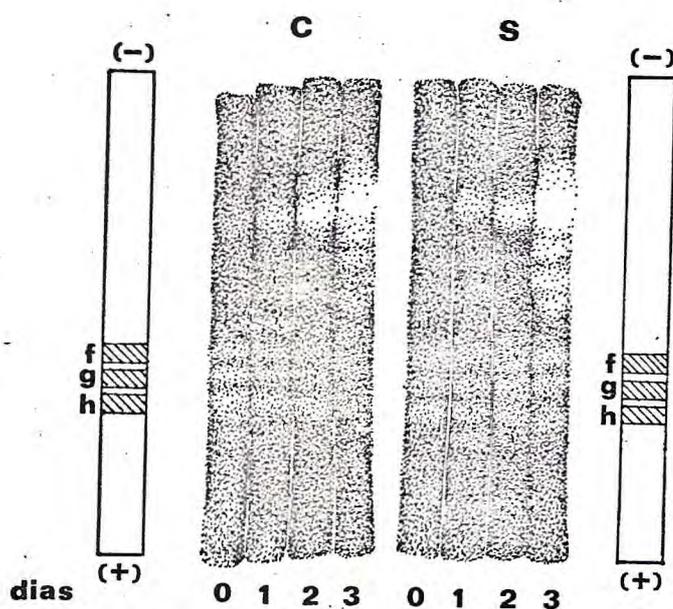


FIGURA 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de β -amilase em extrato de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata*(L.) Walp) semeadas em água destilada. Os extratos continham de 8 a 14mg de proteínas por mililitro e os números representam os dias ao longo do processo germinativo em que foram preparados os extratos.

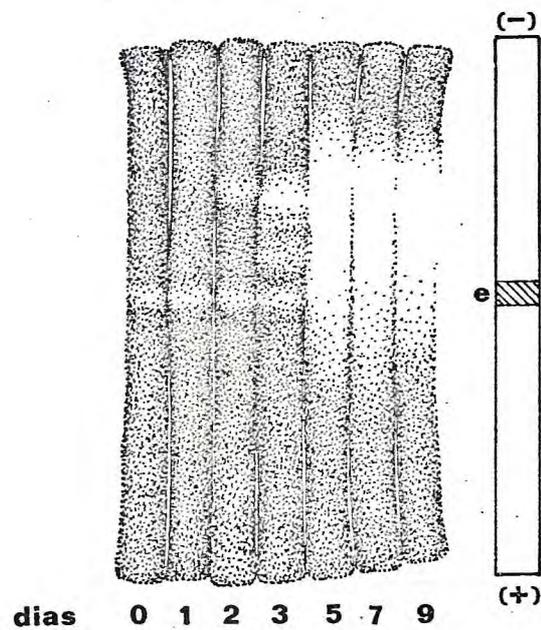


FIGURA 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de fosforilase em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata*(L.) Walp) semeadas em água destilada. Os extratos continham 3mg de proteínas por mililitro e os números representam os dias ao longo do processo germinativo em que foram preparados os extratos.

ção média quando comparada com as de α e de β -amilases, desaparece quando aquecida a 70°C por 15 minutos na presença de CaCl_2 3mM e se mostrar ativa somente quando os géis foram incubados em amido 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 6,0. Esta fosforilase apresentou o seguinte valor médio de R_f de 0,54.

Nos experimentos para detecção de isoenzimas de fosforilase no tratamento salino (FIGURA 15), também foi encontrada somente uma banda (e). Esta banda teve características e comportamento semelhantes àquela do tratamento controle e seu valor médio de R_f foi 0,54.

Do extrato utilizado para a determinação de isoenzimas de fosforilase e de α e β -amilases foram retiradas amostras e feita eletroforese para detecção de proteínas (FIGURA 16). No experimento feito com extratos do tratamento controle observou-se a existência de diversas bandas de proteínas no dia zero e estas foram diminuindo ao longo do processo germinativo até desaparecerem quase completamente no final do experimento, apesar de terem sido aplicadas quantidades equivalentes de proteínas.

Com relação aos experimentos com as sementes oriundas do tratamento salino (FIGURA 17), foram observadas diversas bandas de proteínas no dia zero que foram diminuindo até o 99 dia após a semeadura, sendo que em relação ao tratamento controle as bandas foram desaparecendo mais lentamente e no 99 dia havia mais bandas que no controle.

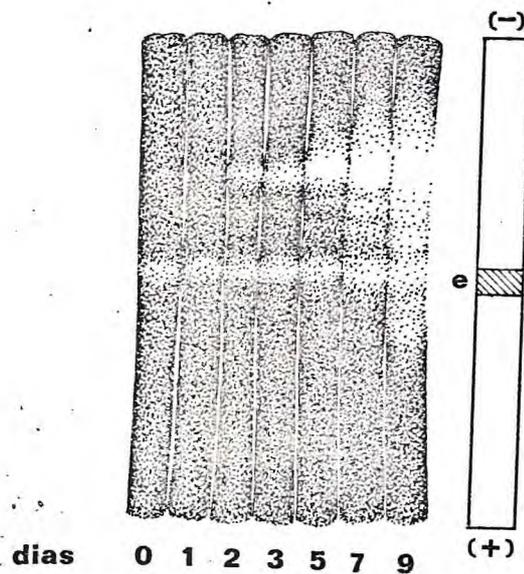


FIGURA 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de isoenzimas de fosforilase em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata*(L.) Walp) semeadas em solução de NaCl 0,1M. Os extratos continham 3mg de proteínas por mililitro e os números representam os dias ao longo do processo germinativo em que foram preparados os extratos.

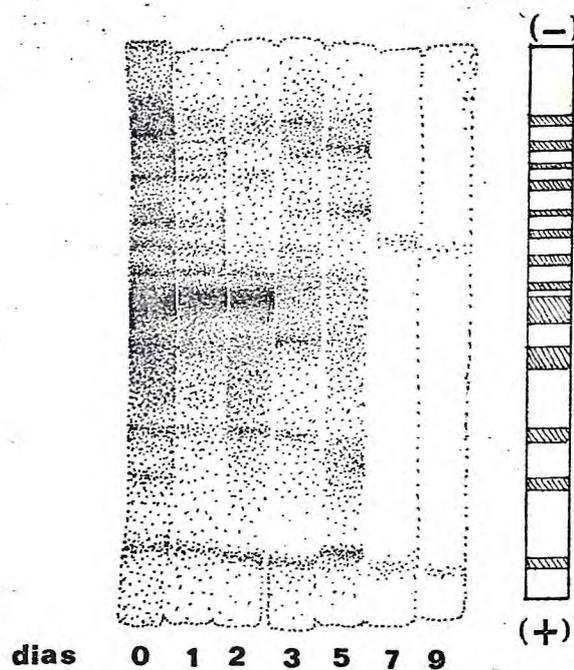


FIGURA 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de proteínas em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) semeadas em água destilada. Os extratos continham 3mg de proteínas por mililitro e os números representam os dias ao longo do processo germinativo em que foram preparados os extratos.

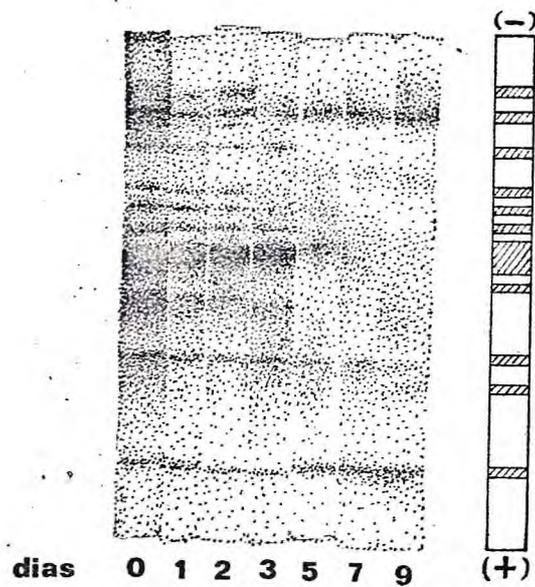


FIGURA 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de proteínas em extratos de cotilédones provenientes de sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) semeadas em solução de NaCl 0,1M. Os extratos continham 3mg de proteínas por mililitro e os números representam os dias ao longo do processo germinativo em que foram preparados os extratos.

4 - DISCUSSÃO

Quando sementes de Vigna unguiculata foram semeadas em solução NaCl 0,1M e comparadas com aquelas semeadas em água destilada, observou-se que a salinidade, além de inibir a germinação (GOMES FILHO, 1978; ENÉAS FILHO, 1979), provocou um retardamento no desenvolvimento das plântulas (FIGURA 1). Isto pode ser interpretado como sendo devido, primordialmente, ao excesso de sais no meio de germinação, que provoca decréscimo do gradiente de potencial hídrico entre o ambiente externo e a semente, acarretando uma diminuição na cinética de embebição e consequente inibição na velocidade e percentagem de germinação (STROGONOV, 1964; PRISCO & O'LEARY, 1970a). Este mecanismo de inibição é comumente denominado na literatura especializada de "efeito osmótico". Por outro lado, se considerarmos que a germinação pode ser dividida em duas fases (emersão da radícula e desenvolvimento da plântula) e que a primeira depende, essencialmente, da cinética de embebição e a segunda da mobilização de reserva da semente (BEWLEY & BLACK, 1978), pode-se concluir que a inibição da primeira fase da germinação deve-se, primordialmente, ao "efeito osmótico" (PRISCO & O'LEARY, 1970a). Os resultados apresentados na FIGURA 1 demonstram que a salinidade também inibe a segunda fase do processo germinativo. Durante esta fase as reservas da semente devem ser hidrolisadas e os produtos de hidrólise translocados para o eixo embrionário, onde, além de serem utilizados como substrato para respiração, liberando energia que será aproveitada na síntese de novos produtos, podem também servir de matéria prima para síntese de novos compostos mais complexos, necessários para o crescimento do eixo embrionário. O amido cotiledonário pode ser hidrolisado pelas enzimas fosforilase, α e β -amilases, sendo seus produtos de hidrólise utilizados, em parte para a produção de ener

gia nos cotilédones e o restante translocado para o eixo embri_onário, onde servirão de substrato respiratório e matéria pri_ma (esqueleto de carbono) para a síntese de compostos mais com_plexos. Diversos autores observaram que quando as sementes eram germinadas em substrato salino os efeitos deletérios dos sais se manifestavam através de uma redução na mobilização das re_servas cotiledonárias (VIEIRA, 1975; PRISCO & VIEIRA, 1976; GO_MES FILHO & PRISCO, 1978; ENÉAS FILHO, 1979).

Quando estudou-se a atividade fosforilásica de semen_tes de Vignâ unguiculata em função do pH, encontrou-se resulta_dos concordantes com os obtidos por TÁRRAGO & NICÓLAS (1976) para sementes de lentilhas (FIGURA 2).

A salinidade provoca diminuição nos níveis de ativida_de tanto das amilases (PRISCO, et al., 1981) como da fosforila_se (TABELA 1, FIGURAS 5 e 6) existentes nos cotilédones. A ati_vidade fosforilásica específica foi igual nos dois tratamentos, a não ser do 7º dia, levando-nos a pensar que as diferenças em atividade total seriam devidas a uma diminuição na "solubiliza_ção" da fosforilase. Resultados semelhantes são observados quando se examina o comportamento das proteínas solúveis. Pro_vavelmente isto ocorre devido ao retardamento da embebição de água pela semente no tratamento salino, acarretando como conse_quência uma menor "solubilização" das proteínas. Refletindo-se este fato em uma aparente diminuição da atividade total da fos_forilase.

A atividade fosforilásica total (TABELA 1, FIGURA 5) de cotilédones provenientes de sementes semeadas em água desti_lada cresceu desde o dia zero até o 1º dia após a semeadura quando começou a decrescer até o 7º dia. Este comportamento da fosforilase aliado ao fato de que o conteúdo de amido nos coti_lédones permaneceu quase inalterado (TÁRRAGO & NICÓLAS, 1976; ENÉAS FILHO, 1979) quando sua atividade era máx_ima, sugere que o caminho fosforolítico para a degradação das reservas de ami_l

do nos cotilédones do feijão de corda pitiúba não seja muito importante. A função deste caminho metabólico durante os primeiros estágios do processo germinativo poderia ser o de prover substrato (glicose-1-fosfato) para a glicólise independente da utilização de ATP (TÁRRAGO & NICÓLAS, 1976). Em ervilha, a fosforilase desempenha importante papel na degradação de amido nos primeiros estágios da germinação sendo seguida, posteriormente, pelas amilases (BEWLEY & BLACK, 1978). Devido ao fato da atividade fosforilásica em *V. unguiculata* pré-existir na semente quiescente, aumentando no 1º dia após a sementeira e decaindo daí até o 7º dia, nos faz crer que este aumento em atividade possa ser devido a "solubilização" de uma fosforilase pré-existente na semente quiescente. Resultados semelhantes foram encontrados em ervilha (JULIANO & VARNER, 1969) e em lentilha (TÁRRAGO & NICÓLAS, 1976), que também são leguminosas não endospérmicas.

O comportamento da atividade específica (TABELA 1, FIGURA 6) reforça a hipótese de que as fosforilases são enzimas que não sofrem síntese de novo e sim são "solubilizadas". Em apoio a isto há vários registros na literatura de queda de atividade fosforilásica nos órgãos de reserva ao longo do processo germinativo (JULIANO & VARNER, 1969; TÁRRAGO & NICÓLAS, 1976). Nos cotilédones provenientes de sementes semeadas em solução salina, o comportamento da fosforilase parece ser o mesmo da quele observado em cotilédones de sementes semeadas em água destilada. Observa-se no entanto um retardamento da atividade desta enzima no decorrer de todo o processo germinativo o que nos leva a crer que o NaCl no meio de crescimento da plântula retarda a "solubilização" da enzima (TABELA 1, FIGURAS 5 e 6).

A atividade fosforilásica total em eixos embrionários (TABELA 2, FIGURA 8) provenientes de sementes semeadas em água destilada cresceu entre o dia zero e o 5º dia após a sementeira decrescendo daí até o 9º dia. Este comportamento da fosforilase, juntamente com o fato do teor de amido no 5º dia após a sementeira (ENÉAS FILHO, 1979) coincidindo, com o seu dia de máxi

ma atividade fosforilásica, sugere que esta enzima pode estar envolvida também na síntese de amido e não apenas na degradação. Indicações de que a fosforilase pode mostrar este comportamento são dadas por TSAI & NELSON (1969) e por BEWLEY & BLACK (1978). Todavia, a sua contribuição para a síntese de polissacarídeos no eixo embrionário deve ser secundária. Esta conclusão baseia-se no fato de que os valores de atividade no eixo embrionário foram bastante inferiores aos encontrados nos cotilédones (FIGURAS 5 e 8).

A atividade fosforilásica específica em eixos embrionários, oriundos de plântulas semeadas em água destilada e NaCl 0,1M, cresceu até o 1º dia após a semeadura, quando decresceu até o último dia do experimento (TABELA 2, FIGURA 9). A aparente discordância entre o comportamento da atividade específica e da atividade total, deve-se ao fato da concentração de proteínas aumentar muito mais rapidamente (entre o 1º e 7º dias) do que a atividade fosforilásica.

Nos eixos embrionários de plântulas provenientes de sementes semeadas em solução salina, o comportamento da fosforilase parece ser o mesmo daquele observado em eixos embrionários oriundos do tratamento controle (sementes semeadas em água destilada). No entanto, observa-se aqui também um retardamento na atividade desta enzima em todo o processo germinativo, o que vem a reforçar a idéia de que o NaCl no meio de crescimento da plântula retarda o aparecimento da atividade fosforilásica (TABELA 2, FIGURAS 7 e 8).

Um máximo de quatro bandas com atividade α -amilolítica apareceu na eletroforese dos extratos de cotilédones do feijão de corda pitiúba semeadas em água destilada (tratamento controle), durante a germinação, sendo que três bandas de fraca intensidade foram encontradas nos dias 0, 1, 2 e 3, e quatro bandas bem intensas nos dias 5, 7 e 9 após a semeadura (FIGURA 11) observa-se então, que a atividade α -amilolítica já pré-existe

em sementes quiescentes, aumentando no decorrer do processo germinativo. Este comportamento das α -amilases, aliado ao fato de que o teor de amido na semente quiescente é normalmente alto e decresce a medida que o processo germinativo se desenvolve (JULIANO & VARNER, 1969; TÁRRAGO & NICÓLAS, 1976; ENÉAS FILHO, 1979), sugere que estas enzimas estejam envolvidas na degradação de amido. Resultados semelhantes foram encontrados em ervilha (JULIANO & VARNER, 1969) e em lentilhas (TÁRRAGO & NICÓLAS, 1976). O aparecimento de novas bandas na germinação dá indicações de uma possível síntese de novo destas enzimas. Isto é reforçado pelo fato de que a α -amilase é sintetizada de novo durante a germinação de cevada (FILNER & VARNER, 1967), de trigo (BEWLEY & BLACK, 1978) e de Avena fatua (CHEN & PARK, 1973). Além disso, a "formação" de α -amilase foi observada durante a germinação de ervilha (YOMO & VARNER, 1973).

Nos experimentos para detecção de isoenzimas de α -amilase no tratamento salino observou-se um máximo de quatro bandas, sendo que foi encontrada uma banda de fraca intensidade nos dias 0, 1, 2 e 3 e quatro bandas bem intensas nos dias 5, 7 e 9 após a semeadura (FIGURA 12). Estes resultados mostram que o NaCl no meio de crescimento das plântulas retarda a possível síntese de novo da enzima, mas não provoca o surgimento de nenhuma nova banda de atividade.

Nos experimentos para detecção de isoenzimas de β -amilase no tratamento controle surgiu um máximo de três bandas pouco intensas nos dias 0, 1 e 2 após a semeadura (FIGURA 13). Observa-se que sua atividade é muito baixa e declina até o completo desaparecimento. Estes resultados sugerem que a β -amilase já existente na semente quiescente depois de exercer sua função é destruída. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por TÁRRAGO & NICÓLAS (1976) em cotilédones de lentilhas. ENÉAS FILHO (1979) também encontrou para a mesma cultivar de Vigna unguiculata três isoenzimas de β -amilase, embora as mesmas estivessem presentes no 5º e 7º dias. Esta discordância parcial talvez se deva ao fato de que a metodologia por ele usada para de

tectar β -amilase não foi específica, baseando-se a sua estimativa na diferença entre as atividades amilásica total e α -amilásica, o que em níveis baixos de atividade não nos dá um resultado muito preciso.

Nos experimentos para detecção de isoenzimas β -amilase no tratamento salino, surgiu o mesmo número de bandas até o 3º dia (FIGURA 13). Nos outros dias elas estiveram ausentes e observou-se também que a atividade foi baixa e declinou até total desaparecimento. Não se observou qualquer efeito do NaCl no meio de crescimento da plântula com relação à enzima β -amilase. Talvez seja porque as isoenzimas foram de difícil detecção, tendo sido preciso inclusive aumentar a concentração de proteínas tanto nos extratos de cotilédones de sementes do tratamento controle, como nos extratos de cotilédones de sementes do tratamento salino.

Nos experimentos para determinação de isoenzimas de fosforilase no tratamento controle foi encontrado apenas uma banda durante o período experimental estudado (FIGURA 14). Percebeu-se que a atividade fosforilásica já pré-existe em sementes quiescentes. O fato da mobilidade eletroforética da fosforilase (banda e, $R_f = 0,54$) ser semelhante a da α -amilase (banda d, $R_f = 0,47$), combinado com a pouca resolução das bandas de isoenzimas de α -amilase, impossibilita a confirmação do desaparecimento da atividade ao longo da germinação. Este mesmo fato também pode ser responsável pelo comportamento semelhante entre controle e sal. Podemos afirmar no entanto que o NaCl não provocou o surgimento de nenhuma nova banda de atividade durante o processo germinativo (FIGURA 15).

Com relação à eletroforese efetuada para detecção de proteínas (FIGURAS 16 e 17) a fim de se obter um estudo comparativo com os experimentos de atividade, observou-se que houve um desaparecimento das proteínas nos extratos de cotilédones das sementes, tanto no tratamento controle como do salino, embora a quantidade de proteína aplicada tenha sido semelhante

quando dosada pelo método de microbiureto. Isto pode ser explicado pelo fato do método de microbiureto revelar também polipeptídios pequenos que podem difundir do gel. O desaparecimento das proteínas de extratos de cotilédones do tratamento salino foi mais acentuado. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por PRISCO & VIEIRA (1976). Além disso, constatou-se que a salinidade não provocou aparecimento de novas proteínas durante o processo germinativo.

A salinidade parece não ter provocado o aparecimento de novas formas de amilases e fosforilases no que diz respeito à mobilidade eletroforética. Supõe-se que a presença do sal no meio de crescimento das sementes, provoque uma queda na síntese de novo de algumas isoenzimas com atividade α -amilásica pois como sabemos a salinidade inibe a síntese de proteínas (KAHANE & POLJAKOFF-MAYBER, 1968; PRISCO & O'LEARY, 1970b).

5 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- a - quando sementes foram semeadas em solução de NaCl 0,1M, observou-se que a salinidade inibiu a germinação e provocou um retardamento no desenvolvimento das plântulas.
- b - a salinidade provocou um retardamento na atividade fosforilítica, tanto em cotilédones como em eixos embrionários, que foi interpretado como sendo decorrência da menor "solubilização" desta enzima no tratamento salino.
- c - a atividade α -amilolítica pré-existe em sementes quiescentes, aumentando no decorrer do processo germinativo.
- d - um máximo de quatro bandas com atividade α -amilolítica apareceu na eletroforese dos extratos de cotilédones provenientes de sementes semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M.
- e - o aparecimento de novas bandas de atividade α -amilolítica ao longo do processo germinativo sugere uma possível síntese de novo desta enzima.
- f - a salinidade retarda a possível síntese de novo de isoenzimas de α -amilase, mas não provoca ao longo do processo germinativo o surgimento de nenhuma nova banda de atividade.
- g - a atividade β -amilásica, apesar de ser muito baixa, pré-existe em sementes quiescentes e depois de exercer sua função é destruída.
- h - um máximo de três bandas com atividade β -amilolítica apareceu na eletroforese dos extratos de cotilédones provenientes

entes de sementes semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1M.

- i - enquanto que no tratamento controle as bandas de atividade de β amilolítica desapareceram no 3º dia, no tratamento salino isto ocorreu somente no 4º dia.
- j - a atividade fosforilásica pré-existe em sementes quiescentes.
- l - o fato da mobilidade eletroforética da fosforilase ser semelhante a da α -amilase, combinado com a pouca resolução das bandas de isoenzimas de α -amilase, impossibilita a confirmação do desaparecimento da atividade fosforolítica ao longo do processo germinativo.
- m - a salinidade não provocou o surgimento de nenhuma nova banda de atividade fosforolítica durante a germinação.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R.J.L. The estimation of phosphorus. Biochem. J., 34 B: 858-865, 1940.
- BERNSTEIN, L. Osmotic adjustment of plants to saline phase.II. Dinamic phase. Am. J. Bot., 50: 360-370, 1963.
- BERNSTEIN, L. Effects of salinity and sodicity on plant growth. Ann. Rev. Phytopathol., 13: 295-312, 1975.
- BEWLEY, J.D. & M. BLACK. Physiology and Biochemistry of seeds. Vol. 1 Springer-Verlag, New York, U.S.A. 306 p, 1978.
- BOYKO, H. Salinity and Aridity: New approaches to old problems. Junk the Hague, Publ., 408 p, 1966.
- BRAGA, R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 3^a ed. Col. Mossoroense vol 42, Rio Grande do Norte, Brasil, 540p, 1976.
- BUFFUM, B.C. Alkali: some observations and experiments Wyoming Agric. Exper. Sta. Bul., 29: 219-253, 1896.
- BUFFUM, B.C. Alkali studies III. Germinating experiments with alkali salts. 9th Ann Rep. Wyoming Agric. Exper. Sta. Bul., 1-40, 1899.
- CARTER, D.L. Problems of salinity in agriculture. In: Poljakoff-Mayber, A. & J. Gale (ed). Ecological Studies. Plants in Saline Environments. Springer-Verlag, New York, U.S.A., pp. 25-35, 1975.

- CHEN, S.S.C. & PARK W. Early actions of gibberellic acid on the embryo and on the endosperm of Avena fatua seeds. Plant Physiol., 52: 174-176, 1973.
- CLARKE, J.T. Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 428-436, 1964.
- ENEAS FILHO, J. Efeitos da Salinidade na Mobilização de Carboidratos de Reserva do Feijão de Corda Pitiúba (Vigna sinensis (L.) Savi) durante a Germinação). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 78p, 1979.
- FILNER, P. & VARNER, J.E. A test for de novo synthesis of enzymes: Density labeling with H_2O^{18} of barley α -amylase induced by gibberellic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 58: 1520-1526, 1967.
- FLOWERS, T.J., TROKE, P.F. & YEO, A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann. Rev. Plant. Physiol., 28: 89-121, 1977.
- GOA, J. A microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5: 218-222, 1953.
- GOMES FILHO, E. & PRISCO, J.T. Effects of NaCl salinity in vivo and in vitro on the proteolytic activity of Vigna sinensis (L.) Savi cotyledons during germination. Revta. Brasil. Bot., 1: 83-88, 1978.
- JULIANO, B.O. & VARNER, J.E. Enzymic degradation of starch granules in the cotyledons of germinating peas. Plant Physiol., 44: 886-892, 1969.

- KAHANE, I. & POLJAKOFF-MAYBER, A. Effect of substrate salinity on the ability for protein synthesis in pea roots. Plant Physiol., 43: 1115-1119, 1968.
- MACKAY, D.B. The measurement of viability. In: Roberts, E. H. (ed). Viability of Seeds. Chapman and Hall Ltd., Londres, Inglaterra, pp. 172-208, 1972.
- MARKUS, A., J. FEELEY & VOLCANI, T. Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetic of amino acid incorporation, ribosome activation, and polysome formation. Plant Physiol., 41: 1167-1172, 1966.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. The Germination of Seeds. Pergamon Press, New York, U.S.A., 236p, 1963.
- OKAMOTO, K. & OKAZAWA, T. Enzymic Mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. Plant Physiol., 65: 81-84, 1980.
- O'LEARY, J.W. High humidity overcomes lethal levels of salinity in hydroponically grown salt-sensitive plants. Plant and soil, 42: 717-721, 1975a.
- O'LEARY, J.W. Completion report of the activities performed as part of the multinational project on biochemistry of the regional scientific and technological development program (SBS-514) 95 p, (mimeografado) 1975b.
- OTA, Y., R. FUJII & OSAWA S. Changes in chemical constituents during the germination of a bean, Vigna sesquipedalis. J. Biochem. (Japan), 40: 649-661, 1953.
- PALMIANO, E.P. & JULIANO, B.O. Biochemical changes in the rice grain during germination. Plant. Physiol., 49: 751-756, 1972.

- PRISCO, J.T. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins of salt and water stressed embryo-axis of Phaseolus vulgaris L. seeds during germination. Cienc. Agron., 1: 47-50, 1971.
- PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. Revta. Brasil. Bot., 3: 85-94, 1980.
- PRISCO, J.T. & O'LEARY, J.W. Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of Phaseolus vulgaris L. seeds. Turrialba, 20: 177-184, 1970a.
- PRISCO, J.T. & O'LEARY, J.W. Effects of salt and water stresses on protein synthesizing capacity of embryo-axis of germinating Phaseolus vulgaris L. seeds. Rev. Brasil. Biol., 30: 317-321, 1970b.
- PRISCO, J.T. & O'LEARY, J.W. The effect of humidity and cytokinin on growth and water relations of salt-stressed bean plants. Plant and Soil, 39: 263-276, 1973.
- PRISCO, J.T. & VIEIRA, G.H.F. Effects of NaCl salinity on nitrogeous compounds and proteases during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant. 36: 317-320, 1976.
- PRISCO, J.T., ENÉAS FILHO, J. & GOMES FILHO, E. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization of Vigna unguiculata (L.) seeds. Revta. Brasil. Bot., 4: 63-71, 1981.
- SHEORAIN, V.S. & WAGLE, D.S. Study of amylases of germinating bajra (Pennisetum typhoides) and barley (Hordeum vulgare) varieties. Biochem. Physiol. Pflanzen, 169: 219-223, 1976.

- STROGONOV, B.P. Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants. Traduzido do russo por Poljakoff-Mayber A. & MAYER, A. M., Program for Scientific Translations Ltd, Israel 279p, 1964.
- SWAIN, R.R. & DEKKER, E.E. Seed germination studies. I. Purification and properties of an α -amylase from the cotyledons of germinating peas. Biochem. Biophys. Acta, 122: 75-86, 1966a.
- SWAIN, R.R. & DEKKER, E.E. Seed germination studies. II. Pathways for starch degradation in germinating pea seedlings. Biochem. Biophys. Acta, 122: 87-100, 1966b.
- TÁRRAGO, F.J. & NICÓLAS, G. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. Plant Physiol. 58: 618-621, 1976.
- TSAY, C.Y. & NELSON, E.O. Two additional phosphorylases in developing maize seeds. Plant Physiol., 44: 159-167, 1969.
- VIEIRA, G.H.S. Efeitos da Salinidade na Mobilização de Reservas Nitrogenadas do Feijão de Corda Seridó (Vigna sinensis (L.) Savi) durante a germinação. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 52p, 1975.
- WASEL, Y. Biology of halophytes. Academic Press, New York, USA, 395p, 1972.
- WALTON, D.C. Germination of Phaseolus Vulgaris. I. Resumption of axis growth. Plant Physiol., 41: 298-302, 1966.
- WHELAND, W.J. Phosphorylases from plants. Methods Enzymol., 1: 192-200, 1955.
- YOMO, H. & VARNER, J.E. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. Plant Physiol., 51: 708-713, 1973.