

Este exemplar corresponde a redação final da tese pelo
Enéas Gomes Filho e aprovada pela Comissão Julgadora



EFEITOS DA SALINIDADE NA ATIVIDADE
RIBONUCLEÁSICA DE COTILÉDONES DE
VIGNA UNGUICULATA (L.) WALP CV.
PITIÚBA DURANTE A GERMINAÇÃO

ENEÁS GOMES FILHO

Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará

EFEITOS DA SALINIDADE NA ATIVIDADE
RIBONUCLEÁSICA DE COTILEDONES DE
VIGNA UNGUICULATA (L.) WALP CV.
PITIÚBA DURANTE A GERMINAÇÃO

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de DOUTOR
EM CIÊNCIAS.

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

CAMPINAS - SP

- 1985 -

A meus pais e irmãos,
à minha esposa Albenice e
filhas Leiliane, Aline e Lia

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Ladaslav Sodek, do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, pela segura orientação prestada na realização do presente trabalho, pelo apoio e sobretudo pela amizade.

Aos Professores Dr. Antônio Celso N. Magalhães, Dr. Ivany F. M. Válio e Dr. Paulo Arruda pela revisão crítica deste trabalho e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao Professor Dr. George John Shepherd pelo auxílio na parte de eletroforese e fotografias.

Aos colegas de curso Luiz Edson Mota de Oliveira e Maria Auxiliadora Feio Gomes pela colaboração na realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade oferecida para a realização do curso.

A Universidade Federal do Ceará pelo apoio financeiro para a realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará pela indispensável cooperação para a realização do curso.

Aos Professores Dr. José Tarquínio Prisco e Dra. Maria da Guia Silva Lima pelo incentivo e apoio para a realização do curso.

À todos os Professores, Funcionários e Alunos do Cur
so de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, do Departamento de Fi
siologia Vegetal da UNICAMP, pela ajuda e amizade.

Aos amigos Benetito Gomes, Dora Suely, José Adalber
to, José Humberto, José Maria, Ladaslav Sodek, Luiz Edson,
Luis Santoro, Valdemir Frediane e suas respectivas famílias
que, pela amizade e convivência, tornaram mais agradável nos
sa permanência em Campinas.

De modo especial sou grato à minha esposa Maria Al
benice Gomes pelo incentivo, compreensão e apoio irrestrito du
rante todos os momentos.

Por fim agradeço a todos que, de modo direto ou in
direto, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

I	-	INTRODUÇÃO	1
		1. Salinidade	1
		2. Efeitos da salinidade sobre o processo germinativo	5
		3. Efeitos da salinidade na mobilização das reservas da semente e sobre a atividade ribonucleásica	6
		3.1. Mobilização do ácido ribonucléico (RNA) e a atividade ribonucleásica	8
		4. Objetivos	10
II	-	MATERIAL E MÉTODOS	11
		1. Sementes e condições de germinação	11
		2. Potencial osmótico das soluções de NaCl e manitol	12
		3. Medidas de crescimento	13
		4. Atividade ribonucleásica	14
		5. Atividade desoxirribonucleásica	16
		6. Determinação de proteína nos extratos	17
		7. Eletroforese em gel de poliacrilamida	17
		7.1. Determinação das isoenzimas de RNase nos géis	19
		7.2. Determinação da atividade ribonucleásica em fatias dos géis	20
		7.3. Determinação das bandas de proteínas nos géis	21
		8. Experimentos com cicloeximida	21

9.	Experimentos com radioisótopo	22
10.	Cromatografia de camada delgada	24
11.	Análise estatística	25
III - RESULTADOS E DISCUSSÃO		26
1.	Crescimento das plântulas em condições de <u>es</u> tresse hídrico e salino	26
2.	Atividade ribonucleásica	33
2.1.	Condições apropriadas de ensaio	33
2.2.	Atividade ribonucleásica em condições de estresse hídrico e salino	36
3.	Eletroforese em gel de poliacrilamida	47
3.1.	Efeito do estresse salino sobre as isoen- zimas de RNase	49
3.2.	Isoenzimas de RNase em condições de <u>es</u> - tresse hídrico e salino	65
3.3.	Efeito do sódio dodecil sulfato (SDS) <u>so</u> bre as isoenzimas de RNase	68
4.	Efeito da cicloeximida sobre a atividade ribo- nucleásica durante a germinação	75
4.1.	Experimento com plântulas semeadas em <u>â</u> gua destilada	79
4.2.	Experimento com plântulas semeadas em <u>so</u> lução de NaCl 0,1 M	83
4.3.	Efeito da cicloeximida sobre as isoenzi- mas de RNase de cotilédones de plântulas semeadas em água destilada	89
4.4.	Efeito da cicloeximida sobre as isoenzi- mas de RNase de cotilédones de plântulas semeadas em solução de NaCl 0,1 M	95

5.	Radioatividade e atividade ribonucleásica em fatias dos géis após eletroforese	98
6.	Investigação sobre as possíveis existências de uma protease ativadora da RNase e de um inibidor da enzima	103
7.	Caracterização da isoenzima de RNase correspondente à banda principal	108
7.1.	Capacidade de hidrolisar o DNA	108
7.2.	Curva de pH em presença e ausência de KCl	109
7.3.	Identificação dos produtos de hidrólise resultantes da ação da RNase	111
IV	- DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	118
V	- RESUMO	127
VI	- SUMMARY	130
VII	- ABREVIATURAS	133
VIII-	LITERATURA CITADA	134

I - INTRODUÇÃO

1. Salinidade.

De um modo geral, um solo é considerado salino quando contém sais solúveis em quantidades suficientes para prejudicar o crescimento das plantas. Nos Estados Unidos, o U. S. Salinity Laboratory recomenda a medida da condutividade elétrica como indicativo do nível de salinidade do solo (RICHARDS, 1954). Ainda hoje é estabelecido o valor de $4 \text{ mmho} \times \text{cm}^{-1}$ para a condutividade elétrica do extrato de saturação de um solo, como o mínimo para considerá-lo como salino. Convém ressaltar, entretanto, que como a tolerância ao excesso de sais varia não só com a espécie, como com o tipo de sal e com as características do solo, não é possível estabelecer-se uma concentração mínima de sal no solo a partir da qual as plantas têm seu crescimento reduzido.

As plantas, de acordo com o grau de resistência ou tolerância ao excesso de sais, podem ser separadas em dois grupos: halófitas e glicófitas. As primeiras não apenas toleram a salinidade, como também têm o crescimento estimulado pelo sal (FLOWERS et al., 1977), enquanto que as segundas, quase todas de importância econômica, são susceptíveis ao excesso de sais.

Os sais solúveis que compõem os solos salinos são constituídos, principalmente, pelos cátions de sódio, cálcio e magnésio, e pelos ânions cloreto e sulfato. Outros íons, tais como potássio, bicarbonato e nitrato, ocorrem em pequenas

quantidades (RICHARDS, 1954). Normalmente, tais solos se localizam em regiões de climas áridos ou semi-áridos, onde predominam altas taxas de evaporação, o que faz com que a concentração de sais no solo e na água aumente (RICHARDS, 1954).

É difícil se avaliar com precisão a extensão das áreas salinizadas dispersas pelo mundo, embora seja de valor reconhecidamente elevado. KOVDA (1937), citado por STROGONOV (1964) estima que na União Soviética cerca de 10% de sua área ou seja cerca de 200×10^6 ha estejam salinizados. Nos Estados Unidos, com uma agricultura altamente especializada, a salinidade reduz em mais de 25% a produção de suas áreas irrigadas (BLACK, 1968). Em Punjab, uma região da Índia, algo em torno de $7,4 \times 10^6$ ha dos 31×10^6 ha de terras agrícolas são estimados como salinos. Além disso, piorando mais ainda a situação nesta região, aproximadamente $0,25 \times 10^6$ ha de terras por ano estão tornando-se salinas como resultado de um inadequado sistema de irrigação (RAHEJA, 1966), citado por FLOWERS et al. (1976).

No Nordeste brasileiro, apesar da falta de dados precisos, estima-se que cerca de 20% de suas áreas irrigadas, estejam salinizadas (PIZARRO, 1975). É possível que este problema se agrave devido às condições climáticas desfavoráveis que o Nordeste brasileiro apresenta (região semi-árida), com baixos níveis de precipitações pluviométricas e deficiente sistema de drenagem existente.

Nos últimos anos a pesquisa com salinidade tem tornado-se uma ciência altamente sofisticada. Vários centros de pesquisas, tais como o U. S. Salinity Laboratory, o Food and Agriculture Organization, um órgão das Nações Unidas, o United

Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization, da Universidade Ben Gurion em Negev e algumas outras organizações na Índia são de acordo com EPSTEIN et al. (1980), líderes no desenvolvimento e aplicação de novos métodos de irrigação em áreas salinizadas.

A recuperação de um solo inutilizado pelo excesso de sais ou em vias de inutilização, em geral, envolve grandes investimentos e somente em determinadas circunstâncias poderá ser economicamente viável (STROGONOV, 1964; BLACK, 1968). Como alternativa para resolver o problema da salinidade, surge a necessidade de se desenvolver pesquisas no sentido de se conseguir plantas que sejam resistentes ou tolerantes ao excesso de sais. Para conseguir este intento, é necessário primeiro que se conheça a fisiologia e bioquímica do estresse salino.

Também é importante que se conheça as diferenças fundamentais entre as halófitas e as glicófitas de modo a se conhecer melhor porque uma é resistente e a outra sensível ao excesso de sais. A este respeito, FLOWERS et al. (1977) apontam a habilidade das halófitas em acumular altas concentrações de íons inorgânicos, principalmente nas células das folhas, como uma distinção fundamental deste grupo de plantas daquele das glicófitas. A maioria das evidências sobre a localização desses íons dentro da célula, sugerem ser o vacúolo o reservatório onde eles são acumulados. Por outro lado, o citoplasma para não sofrer desidratação pelo abaixamento do potencial hídrico do vacúolo, se ajusta osmoticamente produzindo solutos orgânicos neutros, principalmente, ácidos orgânicos, compostos nitrogenados e carboidratos. Esta capacidade de acumular compostos orgânicos não é exclusiva das halófitas e nem somente acontece

em situações de estresse salino, como também em condições de estresse de água ou de temperatura (FLOWERS et al., 1977).

As glicófitas, por sua vez, são afetadas pelo excesso de íons em suas folhas, onde provavelmente causam alterações na permeabilidade das membranas e modificações nas atividades enzimáticas (GREENWAY & MUNNS, 1980). Esses mesmos autores, também sugerem como alternativa para explicar a redução no crescimento das glicófitas, o déficit hídrico gerado nos tecidos em expansão pela falta de eletrólitos. Daí eles invocam a incapacidade das glicófitas em controlarem adequadamente a proporção dos íons armazenados nas células das folhas, com o alto transporte de íons em direção a esses órgãos, como sendo a questão central do problema.

Diversas tentativas foram realizadas no sentido de induzir resistência ou tolerância à salinidade nas espécies sensíveis. A esse respeito, PRISCO (1980) numa revisão, cita duas delas: (1) aplicação exógena de reguladores do crescimento para compensar o desequilíbrio no balanço hormonal e conseqüentemente as desordens metabólicas causadas pela salinidade e (2) selecionar, através de melhoramento genético, cultivares mais resistentes à salinidade. Segundo o autor, a primeira não apresentou resultados muito promissores devido às dificuldades em se determinar quanto, quando e como se aplicar os reguladores do crescimento. A segunda, para ter sucesso é indispensável não só o conhecimento acerca da existência de variabilidade genética no que diz respeito à resistência ou tolerância aos sais, bem como saber quais as características morfofisiológicas necessárias para que uma planta se torne resistente. É justamente neste último ponto onde o autor acha que

há maior carência de informações.

De um modo geral, as pesquisas aplicadas no sentido de minorar os efeitos da salinidade ou de induzir resistência ou tolerância aos cultivares, não têm apresentado melhores resultados por falta de informações básicas acerca da fisiologia e bioquímica das plantas em condições salinas. Neste sentido, deve-se dar ênfase primordial ao estudo da germinação de sementes sob condições de estresse salino, não só por ser esta a etapa inicial do processo de formação de qualquer cultura, como também pelo fato de se conhecer que determinadas espécies são bastante tolerantes aos sais durante o crescimento, mas são extremamente sensíveis durante a germinação (AYERS et al., 1952; RICHARDS, 1954).

2. Efeitos da salinidade sobre o processo germinativo.

A germinação das sementes consiste numa série de eventos morfogenéticos, que resultam na transformação do embrião em plântula. No estado quiescente, as semente se caracterizam por sua baixa atividade metabólica, provavelmente devido ao baixo conteúdo de água (5 a 10%) normalmente observado (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1963).

De acordo com BEWLEY & BLACK (1978) o processo germinativo consiste de duas fases: emersão da radícula e crescimento da plântula. A primeira fase depende fundamentalmente da absorção de água pelas sementes, ocorrendo, inicialmente, independentemente da atividade metabólica, sendo função apenas das forças matriciais da semente. À medida que a semente absorve água, a atividade metabólica aumenta e tem início o pro

cesso germinativo. Na segunda fase, que ocorre logo após a emergência da radícula dá-se o início do processo de mobilização das reservas da semente dos cotilédones ou de outros órgãos de reserva para o eixo embrionário.

A salinidade inibe a germinação das sementes não só porque reduz o gradiente de potencial hídrico entre a semente e o solo (efeito osmótico), reduzindo sua absorção de água (UHVITS, 1946; PRISCO & O'LEARY, 1970a), mas porque também altera de maneira significativa o metabolismo, causando inibição na mobilização das reservas da semente (PRISCO & VIEIRA, 1976; GOMES FILHO & PRISCO, 1978; PRISCO et al., 1981; CASTRO, 1982; GOMES FILHO et al., 1983). Parte das alterações metabólicas causadas pela salinidade deve-se ao fato dos íons serem absorvidos em quantidades suficientes para promover um efeito tóxico (UHVITS, 1946; PRISCO & O'LEARY, 1970a). De acordo com PRISCO & O'LEARY (1970a) os efeitos osmóticos do sal predominam quando é baixa a concentração salina, enquanto que os efeitos tóxicos dos sais predominam em concentrações mais elevadas. Todavia, independentemente da concentração salina, a salinidade ao inibir o processo germinativo o faz porque afeta principalmente a segunda fase do processo germinativo, ou seja, aquela que ocorre logo após a emergência da radícula, causando em consequência uma forte inibição na mobilização das reservas da semente.

3. Efeitos da salinidade na mobilização das reservas da semente e sobre a atividade enzimática.

Existem dados na literatura que mostram que a salin

nidade inibe a mobilização de proteínas (PRISCO & VIEIRA, 1976; GOMES FILHO & PRISCO, 1978; CASTRO, 1982), carboidratos (PRISCO et al., 1981) e ácidos nucleicos (VIEIRA, 1975; SHEORAN & GARG, 1978; GOMES FILHO et al., 1983) que são as principais reservas de muitas sementes.

Os estudos realizados sobre os efeitos da salinidade nas enzimas envolvidas com o processo de mobilização das reservas, têm revelado que, de um modo geral, aquelas que preexistem na semente quiescente em altos níveis, são pouco inibidas ou não são afetadas pela presença de sal no meio de germinação (PRISCO & VIEIRA, 1976; GOMES FILHO & PRISCO, 1978; CASTRO, 1982). No entanto, aquelas que se encontram em baixos níveis na semente quiescente e aumentam de atividade com a germinação, são fortemente afetadas pela salinidade (VIEIRA, 1975; SHEORAN & GARG, 1978; PRISCO et al., 1981; GOMES FILHO et al., 1983). Portanto, apesar da existência de poucos estudos nessa área parece que a mobilização das reservas das sementes é afetada, pelo menos em parte, por causa da inibição de algumas das enzimas responsáveis pela hidrólise dessas substâncias.

Por outro lado, ainda há grandes dúvidas sobre a ação dos sais *in vivo* sobre as enzimas localizadas em outras partes da planta e que estão relacionadas com importantes processos metabólicos, que por sua vez também são afetados pela salinidade. Os resultados nesta área são confusos, encontrando-se pesquisadores que reportam diminuições em atividades pelo sal (PORATH & POLJAKOFF-MAYBER, 1968; HASON-PORATH & POLJAKOFF-MAYBER, 1969; KALIR & POLJAKOFF-MAYBER, 1976; SHEORAN & GARG, 1978; ABDEL WAHAB & ZAHRAN, 1981), enquanto outros encontram aumentos (PORATH & POLJAKOFF-MAYBER, 1968;

EL-FOULY & JUNG, 1972; ARAD & RICHMOND, 1973; GOPAL & RAO, 1982) e, ainda há aqueles que não observaram alterações em a tividadade (WEIMBERG, 1970; GREENWAY & OSMOND, 1972; SHEORAN & GARG, 1978). De acordo com SHEORAN & GARG (1978) os efeitos da salinidade sobre a atividade enzimática, variam não só com o tipo de sal, como também com o órgão da planta, estágio de crescimento e com a enzima estudada. Portanto, não só as diferentes maneiras de se expressar as atividades das enzimas, bem como esses fatores apontados por SHEORAN & GARG (1978), podem ser a causa da diversificação nos resultados obtidos.

3.1. Mobilização do ácido ribonucléico (RNA) e a atividade de ribonucleásica.

Estudos sobre a mobilização do RNA nos órgãos de reserva das sementes mostram que, à medida que o processo germinativo se desenvolve, seu conteúdo decresce e a atividade ribonucleásica torna-se crescente (BARKER & HOLLINSHEAD, 1967; PALMIANO & JULIANO, 1972; VIEIRA, 1975; BRYANT et al., 1976a; GOMES FILHO et al., 1983). Embora alguns autores (BRYANT et al., 1976a) não tenham encontrado uma relação muito forte entre o aumento de atividade da ribonuclease (RNase) e as variações no conteúdo de RNA nos cotilédones, é aceito, de um modo geral, que a função fisiológica dessa enzima seja a de produzir nucleotídeos, que são utilizados na síntese de outros tipos de RNAs, tanto nos órgãos de reserva como no eixo embrionário. TVORUS (1976), numa revisão sobre as RNases de plantas, critica alguns autores que atribuem a esta enzima um papel na síntese de RNA e propõe que qualquer hipótese neste sentido de

va ser rejeitada.

Alguns trabalhos foram realizados no sentido de se averiguar a natureza do aumento de atividade da RNase com a germinação, isto é, se ele era devido à uma síntese *de novo* e/ou ativação da enzima. Os resultados obtidos, no entanto, são controvertidos encontrando-se autores que observaram ser o aumento de atividade totalmente dependente da síntese *de novo* da enzima em *Hordeum vulgare* (BENNETT & CHRISPEELS, 1972), parcialmente dependente em *Pisum sativum* (BRYANT et al., 1976a, 1976b) e independente em *Pisum arvense* (BARKER et al., 1974). É óbvio, portanto, que estes últimos autores admitem que a RNase preexiste na semente quiescente numa forma inativa e que é ativada durante a germinação.

Estudos sobre o metabolismo do ácido ribonucléico sob condições de estresse salino realizados em *Vigna sinensis* (VIEIRA, 1975), *Phaseolus aureus* (SHEORAN & GARG, 1978) e *Vigna unguiculata* (GOMES FILHO et al., 1983), mostram que a salinidade, ao inibir a mobilização do RNA nos órgãos de reserva, reduz a atividade da RNase durante os primeiros dias de germinação, sugerindo ser esta enzima a responsável pela hidrólise do RNA. Embora seja evidente que a salinidade afeta a atividade ribonucleásica, há uma escassez de informações a respeito do modo como isto acontece. Não se conhece, por exemplo, se esta redução em atividade é consequência dos efeitos tóxicos do sal ou se é devida apenas aos seus efeitos osmóticos. Além disso, apesar da existência de várias publicações tratando sobre as isoenzimas de RNase de sementes e órgãos de reserva durante a germinação (WILSON, 1969, 1971; BRYANT et al., 1976b; PIETRZAK et al., 1980; JACOBSEN, 1980), ou de outras partes da planta (KAPOOR & SACHAR, 1976; BAUMGARTNER &

MATILE, 1977; WILSON, 1978; CHEVRIER & SARHAN, 1980), a questão sobre as possíveis modificações em seus padrões, como consequência do estresse salino, ainda permanece em aberto. Estes trabalhos, bem como a recente revisão de WILSON (1982) sobre as isoenzimas de nuclease, ressaltam a necessidade de se conhecer melhor as características dessas múltiplas formas de enzima, como meio de se conhecer suas verdadeiras funções biológicas.

4. Objetivos.

De acordo com o que foi exposto é possível que a salinidade iniba o processo germinativo, pelo menos em parte, porque afeta a mobilização das reservas da semente. Pretende-se, utilizando cotilédones de feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), estudar os efeitos da salinidade sobre a RNase, enzima responsável pela mobilização do RNA, analisando-se a ação dos componentes osmóticos e tóxico do estresse salino sobre a atividade da enzima e no processo germinativo. A ação do sal sobre a atividade ribonucleásica *in vivo* será também investigada a nível das possíveis isoenzimas de RNase. Constitui-se também objetivo do presente trabalho investigar o mecanismo envolvido no aumento da atividade ribonucleásica, verificando se este aumento é devido à síntese *de novo* e/ou à ativação de uma ou mais das possíveis isoenzimas de RNase. Espera-se, com isso, dar uma contribuição para o esclarecimento do efeito da salinidade no processo germinativo e, em especial, sobre a ação da RNase na mobilização dos ácidos nucleicos durante o processo de germinação das sementes.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1. Sementes e condições de germinação.

No presente trabalho foram utilizadas sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cv. pitiúba, sa fra de 1983, provenientes da Fazenda Experimental Lavoura Seca, Quixadá, CE, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará. As sementes, após uma rápida limpeza, foram acondicionadas em frascos de vidro, contendo sílica gel, e armazenadas a uma temperatura de 10°C.

As sementes foram selecionadas para germinação de a cordo com a cor, o tamanho e a conformação, sendo excluídas as pequenas, escuras e mal formadas. Depois de selecionadas, com a finalidade de evitar contaminação por microorganismos, as sementes foram esterelizadas superficialmente com uma solução di luída 1:20 de hipoclorito de sódio, contendo 2,5% de cloro ativo (Super Cândida, Indústria Anhembí S/A., São Caetano do Sul, SP) durante 30 minutos, sendo excluídas as que flutuaram na referida solução, bem como aquelas que se apresentaram "queimadas" após esse tratamento. Em seguida, as sementes foram lavadas por 10 vezes com água destilada, a fim de retirar o excesso de cloro residual, e semeadas entre 2 folhas de papel de filtro de 30 cm x 30 cm (papel Mata Borrão Filtro, 80 g/cm², Companhia Fabricadora de Papel, São Paulo, SP), devidamente esterelizadas por autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos. Com exceção de um caso, que será posteriormente espeacificado, as folhas de papel de filtro foram umedecidas com água

destilada ou com soluções de NaCl e manitol. Uma única fileira de 10 sementes foi semeada a aproximadamente 2,5 cm da borda superior do papel. Após a semeadura, 4 conjuntos de folhas de papel de filtro, portando 10 sementes cada, foram enrolados e dispostos verticalmente, dentro de recipientes de vidro de 1.000 ml, cada um contendo 20 ml da mesma solução usada para umedecer o papel. Tais recipientes contendo as sementes, foram cobertos com sacos plásticos preto, presos com fita adesiva em sua volta, de tal modo que a umidade relativa no seu interior foi aproximadamente igual a 100%, e finalmente deixados em câmaras de germinação na obscuridade à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

2. Potencial osmótico das soluções de NaCl e manitol.

Para induzir os estresses hídrico e salino no meio de germinação das sementes, foram usados o manitol (soluto pouco permeável) e o NaCl (soluto permeável). As soluções de manitol e de NaCl foram preparadas de modo a apresentarem o mesmo potencial osmótico. O NaCl foi usado na concentração de 0,1 M, a mesma usada por GOMES FILHO et al. (1983) para estudar os efeitos do estresse salino sobre a mobilização de RNA nos cotilédones de plântulas de feijão. O potencial osmótico da solução de NaCl 0,1 M foi calculado de acordo com a equação de van't Hoff:

$$\pi = -i m R T \phi$$

onde:

π = potencial osmótico (bar);

i = número de íons dissociados da molécula (2, para o NaCl);

m = molalidade;

R = constante dos gases ($0,083 \text{ bar} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$);

T = temperatura absoluta (298 K);

ϕ = coeficiente osmótico.

Tendo em vista a baixa concentração da solução de NaCl, considerou-se, na fórmula, o valor de 0,1 para m , pois nesta situação a molaridade é praticamente igual à molalidade. O valor do coeficiente osmótico (ϕ) para uma solução de NaCl 0,1 m a 25°C é, segundo LANG (1967), 0,932. Substituindo-se a fórmula por seus valores numéricos, encontra-se o valor de -4,6 bar como sendo o potencial osmótico da solução de NaCl 0,1 M.

A concentração da solução de manitol, tendo o mesmo potencial osmótico que aquele da solução de NaCl 0,1 M foi também determinada pela equação de van't Hoff. Neste caso, como o manitol é um soluto não dissociável e a solução é de baixa concentração, os valores de i e ϕ podem ser considerados, com muita aproximação, como sendo iguais a 1 (KRAMER, 1969). Portanto, considerando π como -4,6 bar, e substituindo-se os outros valores na fórmula, encontra-se o valor de aproximadamente 0,19 molal para a concentração de manitol.

Desta forma, as soluções de NaCl 0,1 M e de manitol 0,19 m são isosmóticas e possuem o mesmo potencial da água (ψ) de aproximadamente, -4,6 bar.

3. Medidas de crescimento.

As medidas de crescimento das plântulas foram basea

das nas determinações do comprimento da raiz principal e parte aérea e dos pesos fresco e seco do cotilédone, do sistema radicular e da parte aérea. O comprimento ou peso total da plântula foi estimado pela soma de tais grandezas avaliadas na raiz e parte aérea.

No experimento realizado especificamente para comparar-se os efeitos dos estresses hídrico e salino sobre o crescimento das plântulas, as medidas de crescimento foram efetuadas em plântulas com 7 dias após a semeadura, em água destilada ou em soluções isosmóticas de NaCl e manitol ($\Psi = -4,6$ bar). Foram realizadas 12 repetições, cada uma correspondendo à média das medidas efetuadas em 10 plântulas. Após as determinações de peso fresco, os cotilédones, as raízes e as partes aéreas foram deixadas na estufa a 100°C por 24 horas, quando então foram determinados seus pesos secos.

Nos outros experimentos, avaliou-se o crescimento das plântulas somente através das medidas de comprimento e de peso fresco das várias partes da plântula, sendo efetuadas 3 repetições, cada uma também correspondendo à média das medidas efetuadas em 10 plântulas.

4. Atividade ribonucleásica.

O extrato contendo a atividade ribonucleásica foi preparado de acordo com GOMES FILHO et al. (1983). Após maceração dos cotilédones no almofariz, com tampão fosfato-K 0,1 M, pH 5,7, centrifugou-se o homogenato a $3.000 \times g$ por 10 minutos tendo-se desprezado o precipitado. Em geral, o sobrenadante foi ajustado a pH 5,1 com HCl 0,5 N, seguindo-se um re

pouso em refrigerador por aproximadamente 16 horas e posterior centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos sendo novamente desprezado o precipitado. Esta precipitação tem por finalidade aumentar a atividade específica da ribonuclease do extrato. No entanto, em casos especiais, como medida de precaução para evitar eventuais perdas de atividade por uma ou mais das isoenzimas de ribonuclease, evitou-se este processo de purificação. Todas as etapas da extração foram realizadas à baixa temperatura (4°C).

A reação enzimática foi realizada segundo o método de TUVE & ANFINSEN (1960), e se processou pela adição de 1,0 ml de extrato, convenientemente diluído, a 3,0 ml de tampão citrato-Na 0,05 M, pH 5,2 e 1,0 ml de RNA (NBCo) a 1% no tampão de ensaio. Purificou-se o RNA na forma de um sal de potássio num procedimento semelhante àquele descrito por ARRUDA (1982). Dissolveram-se 2 gramas de RNA com um mínimo volume de KOH 0,5 N e em seguida completou-se o volume para 200 ml com água destilada, ajustando-se o pH com KOH para um valor em torno de 6,0. A essa solução foram adicionados 8 ml de acetato de potássio 50% mantendo-se a solução em agitação. Posteriormente, adicionaram-se pouco a pouco, e mantendo-se a solução em agitação, 500 ml de etanol 95%, sendo a mistura deixada em repouso na geladeira, por cerca de 18 horas, para completa sedimentação do precipitado. Após centrifugação o precipitado foi lavado por 2 vezes com etanol 95%, 2 vezes com etanol absoluto e 2 vezes com éter etílico. Finalmente, o precipitado foi deixado para secar ao ar livre. A temperatura de incubação foi 40°C, sendo retiradas alíquotas de 1,0 ml da mistura nos tempos de 5 e 25 minutos de reação. Essas alíquotas foram colocadas em tubos de en

saio contendo 0,2 ml de acetato de uranila 0,75% em HClO_4 a 25%, o qual tem a função de interromper a reação enzimática. A mistura final, após um repouso em banho de gelo por aproximadamente 30 minutos, foi centrifugada a $1.000 \times g$, à temperatura ambiente. Determinou-se a atividade ribonucleásica através das leituras de absorbância em 260 nm (A_{260}), num espectrofotômetro Varian, em amostras contendo 0,2 ml de sobrenadante do ensaio mais 4,8 ml de água destilada. As diferenças de absorbâncias nos dois tempos de reação ($\Delta A_{260} \times 20 \text{ min}^{-1}$) foram então multiplicadas pelos fatores de diluição, pelo volume do extrato e por 3, para convertê-las em $\Delta A_{260} \times \text{h}^{-1}$, sendo este produto dividido pelo número de cotilédones utilizados na preparação do extrato. Expressou-se a atividade ribonucleásica total em unidades de atividade (UA) $\times \text{cotilédone}^{-1} \times \text{h}^{-1}$, sendo uma UA correspondente a uma ΔA_{260} igual a 0,01.

Tendo-se em vista que uma solução contendo uma mistura de nucleotídeos a $1 \mu\text{mol/ml}$ tem uma A_{260} igual a 10 (WILSON, 1968), uma UA corresponde a 5 nmol de nucleotídeos produzidos na reação enzimática. A atividade ribonucleásica específica foi determinada dividindo-se a atividade total pela concentração de proteína por cotilédone.

Com exceção dos casos especificados nas legendas das figuras e tabelas os valores de atividade ribonucleásica representam médias de 3 repetições, provenientes de extratos diferentes. Cada extrato foi dosado em triplicata.

5. Atividade desoxirribonucleásica.

A reação enzimática foi realizada segundo WILSON

(1968) com pequenas alterações, e se processou pela adição de 0,10 ml do extrato à mistura contendo 1,25 ml de DNA (3 mg/ml) de timo de bezerro (Sigma) desnaturado, 0,25 ml de $MgCl_2$ 0,6 M (ou 0,25 ml de EDTA- Na_4 40 mM) e 0,90 ml de acetato-Na 0,1 M, pH 5,8. As soluções de $MgCl_2$ e de EDTA foram preparadas em tampão acetato-Na 0,1 M, sendo o pH final ajustado para 5,8. Para desnaturar o DNA, 24 mg do ácido nucléico na forma nativa foram dissolvidos em 8 ml de tampão acetato-Na 0,1 M, pH 5,8, tendo a solução, em seguida, sido deixada em banho de água fervendo durante 15 minutos. Após isso, a solução de DNA foi rapidamente resfriada em banho de gelo. A temperatura de reação foi $40^{\circ}C$, e alíquotas de 0,5 ml da mistura de reação foram retiradas nos tempos de 5, 25 e 35 minutos. Essas alíquotas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 0,1 ml de acetato de uranila 0,75% em $HClO_4$ 25%. As etapas seguintes, até as leituras em 260 nm, foram idênticas àquelas para o ensaio de atividade ribonucleásica.

6. Determinação de proteína nos extratos.

Determinou-se a concentração de proteína nos extratos de acordo com o método do microbiureto descrito por GOA (1953), usando-se como padrão a albumina sérica bovina, cristalizada e liofilizada (Sigma).

7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

A eletroforese de disco em gel de poliacrilamida foi

realizada de acordo com o método descrito por DAVIS (1964), com algumas modificações introduzidas por WILSON (1978), sendo usados tubos de acrílico de 9,0 cm x 0,6 cm, contendo 2,0 ml do gel de separação e 0,2 ml do gel de espaçamento. O primeiro consistiu de uma mistura contendo acrilamida (Sigma) 7%, bis-acrilamida (BDN Chemical Ltd.) 0,184% e Tris 0,37 M, sendo o pH final 8,9 (ajustado com HCl 2 N). A bis-acrilamida foi purificada segundo RICHARDS & GRATZER (1968). Doze gramas de bis-acrilamida foram dissolvidos em 1 l de acetona a 48°C, filtrando-se em seguida a mistura, ainda quente, em papel de filtro qualitativo. Posteriormente, deixou-se a solução em repouso no "freezer" a -20°C até completa sedimentação dos cristais de bis-acrilamida. O precipitado, recuperado por filtração em papel de filtro qualitativo, foi lavado com 500 ml de acetona fria e deixado secar ao ar livre. O outro gel era formado por uma mistura contendo acrilamida 3%, bis-acrilamida 0,75% e Tris 0,062 M, sendo o pH final ajustado com ácido cítrico para o valor 6,7. Como tampão de corrida eletroforética foi usado Tris (0,01 M) - glicina (0,076 M), pH 8,3. Em geral, alíquotas de 150 µl do extrato, contendo sacarose numa concentração final de 10%, foram cuidadosamente aplicadas sobre a superfície do gel de menor concentração em acrilamida, e a eletroforese desenvolvida a uma corrente de 2 mA/gel por 20 minutos e a 4 mA/gel durante 90 a 120 minutos à temperatura ambiente. A corrida eletroforética foi interrompida quando a frente contendo o azul de bromofenol atingiu o final da coluna de gel, ou pelo menos uma distância de aproximadamente 0,8 cm de seu final.

7.1. Determinação das isoenzimas de RNase nos géis.

A revelação das isoenzimas de RNase nos géis foi realizada segundo WILSON (1969) com pequenas modificações. Após a corrida eletroforética, os géis foram pré-incubados por 10 minutos com tampão citrato-Na 0,05 M, pH 5,2, à temperatura ambiente; incubados por 20 minutos com RNA 1,0 mg/ml a 40°C e pós-incubados por 2 a 3 minutos com o mesmo tampão de pré-incubação à temperatura ambiente. Em seguida, os géis foram corados por 1 minuto com azul de toluidina 0,2% em ácido acético 0,5%, pH 3,0, lavados com água corrente e deixados em ácido acético 0,5%, com agitações ocasionais. A solução de ácido acético foi trocada em intervalos de tempo de aproximadamente 30 minutos, e após cerca de 1 hora neste ácido começaram a surgir nos géis regiões descoloradas, justamente nos locais correspondentes à presença das isoenzimas de RNase. O aparecimento dessas bandas descoloridas deveu-se ao fato das RNases hidrolisarem o RNA e, conseqüentemente, impedirem a formação do complexo RNA - azul de toluidina no gel. Estas bandas tornaram-se mais nítidas com mais tempo de descoloramento dos géis no ácido acético. Após 3 horas neste ácido, os géis foram deixados em água destilada, onde as bandas se alargam numa velocidade menor do que aquela no ácido acético. Com tempos em água destilada a serem posteriormente especificados, os géis tiveram suas absorbâncias lidas em 580 nm, num espectrofotômetro Varian, com o auxílio de um equipamento de varredura ("scan gel") nele acoplado. Após 20 horas em água destilada os géis foram deixados em HClO₄ 5%, quando mudam da cor azul para a lilás e onde as bandas descoloridas não se alargam demasiada

mente.

Além dos gráficos de A_{580} dos géis, os resultados foram apresentados através de desenhos esquemáticos dos géis feitos logo após os mesmos terem sido deixados em $HClO_4$, e que representam médias de três experimentos. Em alguns casos, além dos gráficos de A_{580} e dos desenhos esquemáticos, foram apresentadas as fotografias dos géis.

7.2. Determinação da atividade ribonucleásica em fatias dos géis.

Determinou-se a atividade ribonucleásica em fatias dos géis após eletroforese, de acordo com WILSON (1969) com pequenas modificações. A reação enzimática foi realizada em condições semelhantes àquelas descritas para o ensaio de atividade ribonucleásica nos extratos. As fatias, em números que serão oportunamente especificados, foram colocadas em tubos de ensaio contendo 4,0 ml de RNA 0,16%, e deixadas por 150 minutos em banho de gelo, com agitações ocasionais, a fim de extrair a enzima. Em seguida, os tubos contendo as fatias foram levados para o banho a $40^{\circ}C$ para que a reação se processasse, sendo então retiradas alíquotas de 1,0 ml da mistura de reação em tempos que serão oportunamente especificados. Essas alíquotas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 0,2 ml de acetato de uranila 0,75% em $HClO_4$ 25%, sendo as etapas seguintes, até as leituras de A_{580} , idênticas àquelas executadas para o ensaio com o extrato. Como prova em branco da reação, fatias de géis sem a presença dos extratos foram incubadas com RNA, em condições idênticas às empregadas para os ensaios com as fa

tias de géis contendo a enzima.

7.3. Determinação das bandas de proteínas nos géis.

Usou-se o método descrito por CHRAMBACH et al. (1967) para a localização das bandas de proteínas nos géis. A pós eletroforese os géis foram tratados com uma solução de TCA 12,5%, por 45 minutos em constante agitação. Posteriormente foram deixados por 120 minutos no corante "coomassie blue" 1% (Coomassie Brilliant Blue R 250), diluído 1:20 com TCA 12,5% momentos antes de ser usado. Finalmente, os géis foram deixados em TCA 10%, efetuando-se algumas trocas da solução, verificando-se que, com 24 a 48 horas nesta solução, as bandas de proteínas tornaram-se mais nítidas.

Os resultados foram apresentados através de fotografias e desenhos esquemáticos dos géis.

8. Experimentos com cicloeximida.

Alguns experimentos preliminares foram desenvolvidos no sentido de determinar-se as melhores condições para a aplicação do inibidor de síntese protéica, e que serão descritos posteriormente. Nos experimentos definitivos, as sementes quiescentes ou os cotilédones de plântulas intactas, semeadas em água destilada ou em solução de NaCl 0,1 M, foram tratadas com cicloeximida 20 µg/ml. A solução do inibidor foi aplicada nos cotilédones através do pincelamento com a referida solução. Exceto para o caso de sementes quiescentes, que foram deixadas

germinar por 24 horas em presença do inibidor (germinação em papel de filtro), apenas os cotilédones foram pincelados com a solução de cicloeximida. Os cotilédones, antes de serem tratados com o inibidor, tiveram seus tegumentos retirados, sendo tomado cuidados para não causar danos físicos aos embriões ou aos próprios cotilédones. Após a aplicação do inibidor nos cotilédones (aproximadamente 25 μ l por cotilédone), as plântulas retornaram para os seus meios originais de germinação. Em média, o volume de inibidor aplicado, demorou cerca de 1 hora para ser totalmente absorvido pelo cotilédone. Um dia após a aplicação do inibidor foram efetuadas medidas de comprimento e de peso fresco, em várias partes das plântulas, sendo os cotilédones armazenados no "freezer" até a ocasião da preparação dos extratos. Nos extratos de cotilédones foram feitas determinações de proteína e de atividade ribonucleásica. No experimento com plântulas semeadas em água destilada, os cotilédones foram tratados com cicloeximida nos dias 0, 1, 2, 3, e 4 de germinação, enquanto que naquele realizado com plântulas semeadas em solução de NaCl 0,1 M, o tratamento foi aplicado nos dias 3, 4, 5 e 6 após a semeadura.

Todo o experimento foi acompanhado por dois conjuntos de plântulas controle: um conjunto que, ao invés de cicloeximida, recebeu tratamento equivalente com água destilada, e o outro que serviu como controle do experimento, e que era formado por plântulas que foram deixadas para germinar em condições normais.

9. Experimentos com radioisótopo.

Nesses experimentos, os cotilédones de plântulas in

tactas foram tratados com uma solução de DL-leucina-1-C-14 (26,4 mCi/mmol, Cal Atomic) diluída para 25.000 cpm/ μ l. A solução do radioisótopo foi aplicada nos cotilédones de maneira idêntica àquela da solução de cicloeximida. No experimento com plântulas semeadas em água destilada, os cotilédones foram pincelados com a solução do radioisótopo (cerca de 25 μ l por cotilédone) nos dias 1, 2 e 3 após a semeadura, tendo sido os cotilédones coletados com 1 dia após a última aplicação do radioisótopo. No caso de plântulas semeadas em solução de NaCl 0,1 M, as aplicações foram efetuadas nos dias 1, 2, 3, 4 e 5, sendo os cotilédones coletados no 6º dia de germinação.

O extrato de cotilédones tratados com o aminoácido marcado foi separado em seus componentes através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a corrida eletroforética os géis foram resfriados até -15°C e cortados em fatias de aproximadamente 1 mm de espessura. Para seccionar os géis em fatias de mesma espessura usou-se um cortador apropriado, formado basicamente por um conjunto de lâminas de barbear separadas entre si por placas planas de alumínio com espessuras de 1 mm.

A determinação da radioatividade nas fatias dos géis foi efetuada segundo ANDREWS (1981). As fatias foram colocadas em discos de fibra de vidro (Whatman GF/C) e deixadas secar ao ar livre por cerca de 18 horas, sendo a radioatividade determinada quantitativamente através da técnica de contagem por cintilação líquida. Os discos de fibras de vidro portando as fatias secas dos géis, foram colocados nos frascos de cintilação, contendo 5 ml do líquido de cintilação, sendo as contagens feitas num cintilador Beckman LS 100-C. Preparou-se

o líquido de cintilação pela mistura de 5 g de PPO e 100 mg de POPOP (ambos os reagentes da Packard Instrument Company Inc.) a 1 l de tolueno (Merck). Em geral, o tempo de contagem das amostras no cintilador foi de 10 minutos, tendo sido as medidas da radioatividade expressas em contagens por minuto (cpm).

10. Cromatografia de camada delgada.

Os produtos de hidrólise liberados pela ação da RNAse sobre o RNA foram separados e identificados através de cromatografia de camada delgada. Foram usadas placas de celulose, preparadas espalhando-se a mistura de 30 g de microcelulose (Merck) em 90 ml de água destilada em placas de vidro de 20 cm x 20 cm, de modo a resultar numa espessura em celulose de 0,3 mm. As amostras, contendo os nucleosídeos e nucleotídeos, foram aplicadas nas placas com tubos de vidro capilares, em volumes que variaram de 10 a 40 μ l dependendo da concentração das amostras. Realizou-se a corrida numa única direção, sendo usado isoladamente dois sistemas de solventes, preparados segundo WALTERS & LORING (1966) com pequenas modificações: solvente I, 960 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 25 ml de água destilada e 75 ml de isopropanol; solvente II, 45 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 ml de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 M, 55 ml de água destilada e 2 ml de isopropanol.

A placa de celulose após corrida no solvente, foi deixada secar à temperatura ambiente e examinada numa câmara escura irradiada com luz ultravioleta de comprimento de onda curto. Nestas condições, os fragmentos de RNA aparecem como man

chas escuras, e os nucleotídeos e nucleosídeos foram identificados através de comparação com padrões apropriados aplicados na mesma placa. Para melhorar a resolução, as placas foram posteriormente pulverizadas com fluoresceína 0,01%, um indicado de fluorescência, sendo depois novamente examinadas no escuro sob luz ultravioleta.

11. Análise estatística.

Os resultados dos experimentos realizados para comparar-se os efeitos dos estresses hídrico e salino sobre o crescimento das plântulas, e aqueles com cicloeximida, foram analisados através de um delineamento inteiramente casualisado. As diferenças entre os vários tratamentos foram determinadas pelo teste F, a partir da análise de variância, sendo as médias comparadas entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (SNEDECOR, 1956).

Usando-se o mesmo delineamento acima, foram determinados os valores da diferença mínima significativa (DMS) para os pontos da curva de atividade ribonucleásica total e específica, referente aos dias 3, 5 e 7 após a semeadura. Calculou-se o DMS ao nível de 5% de probabilidade a partir da análise de variância. Nos gráficos, a representação dos valores de DMS foi feita através de barras verticais nos pontos analisados.

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

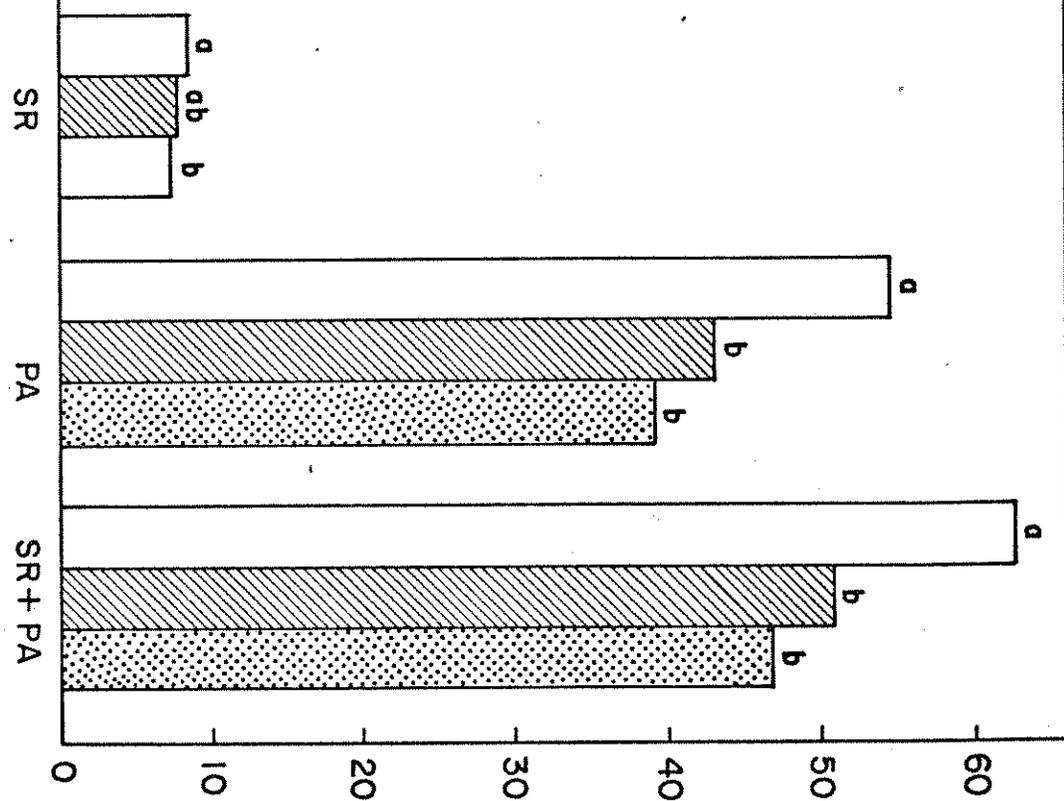
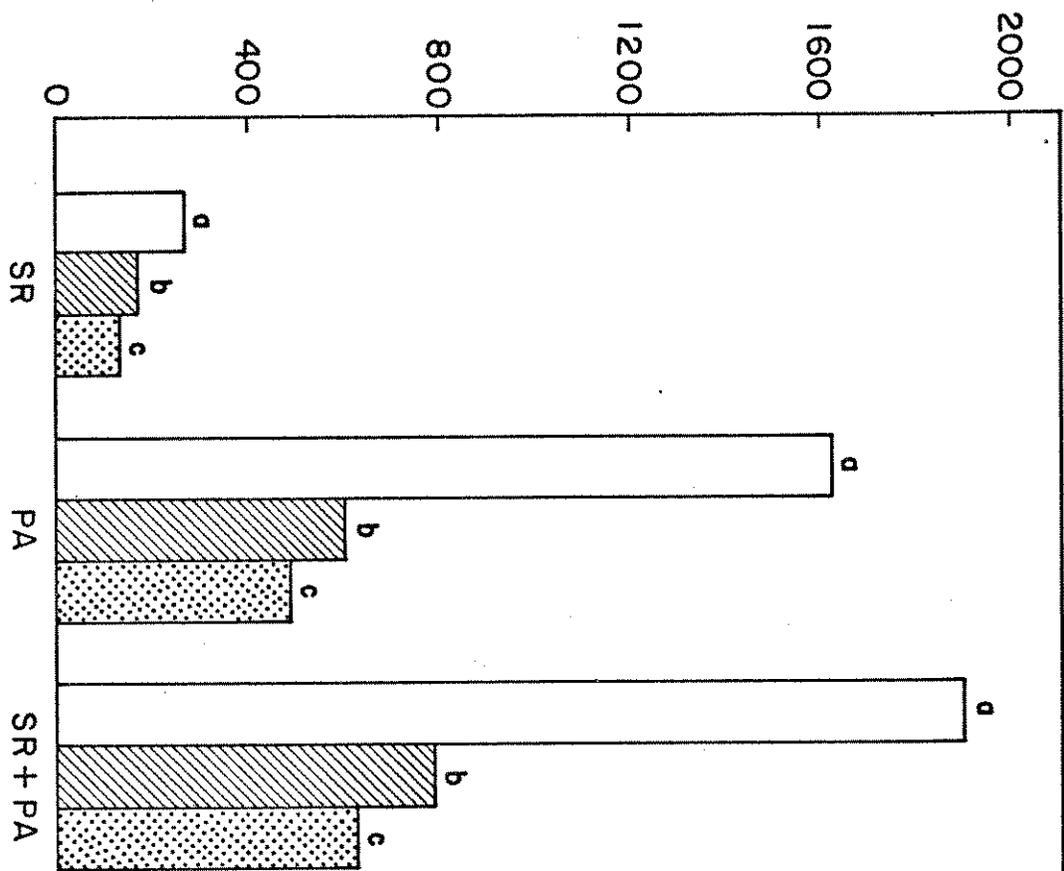
1. Crescimento das plântulas em condições de estresse hídrico e salino.

O crescimento foi expresso através das medidas de comprimento e dos pesos fresco e seco das várias partes da plântula, no 7º dia após a semeadura em água destilada (controle) e em soluções isosmóticas ($\Psi = -4,6$ bar) de NaCl e manitol.

Os pesos frescos do sistema radicular, da parte aérea e da plântula do tratamento controle, mostraram-se estatisticamente superiores àqueles provenientes de plântulas dos tratamentos salino e com manitol (Figura 1). Por outro lado, o peso fresco da plântula (ou de suas partes) do tratamento salino apresentou-se estatisticamente superior àquele da plântula (ou de suas partes) no tratamento com manitol (Figura 1). Portanto, apesar das soluções dos dois agentes osmóticos terem sido preparadas com o mesmo potencial osmótico, observou-se uma diferença significativa (da ordem de 20%) entre os pesos frescos nos dois tratamentos. Uma possível explicação, baseia-se no fato do NaCl ser um soluto comprovadamente mais permeável que o manitol e conseqüentemente possuir menor coeficiente de reflexão. Sendo assim, a maior quantidade de NaCl que penetra no interior da célula causa um maior abaixamento no potencial d'água das raízes. Como conseqüência, maior será o gradiente de potencial d'água entre o meio externo e as raízes e maior será a absorção de água pelas plântulas do tratamento salino. Além disso, há a possibilidade da solução externa de

FIGURA 1 - Pesos fresco e seco do sistema radicular (SR) da parte aérea (PA) e da plântula (SR + PA) de feijão de corda pitiúba, com 7 dias de germinação em água destilada () e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl () e de manitol (). As mesmas letras sobre cada um dos conjuntos de histogramas, indicam médias que não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

PESO FRESCO (mg x parte da plântula⁻¹)



PESO SECO (mg x parte da plântula⁻¹)

manitol ficar com um potencial d'água um pouco mais baixo do que o da solução de NaCl, em decorrência do influxo de água para as plântulas, ocorrer sem grandes perdas de soluto da solução. Em função dessa diminuição no potencial d'água, menor seria o gradiente de potencial d'água entre o meio externo e as raízes, e menor seria a absorção de água pelas plântulas do tratamento com manitol. Concordando com este ponto de vista, MACHADO et al. (1976) observaram que o manitol foi um agente mais efetivo que o NaCl, para induzir deficiência de água durante a germinação de sementes de feijão. De forma semelhante, porém com outro agente osmótico, KAWASAKI et al. (1983), encontraram que o polietileno glicol (PEG) era mais efetivo em reduzir o crescimento das plantas de milho, sorgo e feijão que o NaCl no mesmo potencial osmótico.

Os pesos secos da parte aérea e da plântula do tratamento controle foram estatisticamente superiores aos dos tratamentos salino e com manitol (Figura 1). Apesar do peso seco do sistema radicular no tratamento controle, apresentar uma tendência de ser maior do que aqueles dos outros dois tratamentos, estatisticamente só houve diferença significativa com relação ao do tratamento com manitol (Figura 1). Os resultados de peso seco foram concordantes com os de peso fresco, e sugerem que a presença de NaCl ou de manitol no meio de germinação das plântulas inibe a mobilização e/ou o transporte das reservas do cotilédone para as outras partes da plântula, afetando drasticamente o seu crescimento (PRISCO & VIEIRA, 1976; GOMES FILHO et al., 1983). Por outro lado, o fato do peso fresco ter sido mais afetado pelo estresse do que o peso seco (Figura 1), demonstra que a presença de NaCl ou de manitol no meio

de germinação reduz significativamente a absorção de água pelas plântulas.

Os pesos fresco e seco dos cotilédones do tratamento controle foram significativamente inferiores aos dos outros tratamentos (Figura 2), embora a diferença tenha sido mais proeminente para o caso do peso seco. Como pode ser notado, enquanto o peso fresco do cotilédone do tratamento controle foi apenas cerca de 50% menor do que os dos outros tratamentos, a redução no peso seco foi de aproximadamente 80% (Figura 2). Este resultado foi compatível com os dos pesos secos em outras partes das plântulas (Figura 1), e reforça a idéia de que os estresses hídrico provocado pelo manitol, e o salino pelo NaCl, prejudicam sensivelmente a mobilização das reservas do cotilédone para as outras partes da plântula. Embora a análise estatística não tenha acusado diferença significativa entre os valores de peso seco dos cotilédones dos tratamentos com NaCl e manitol, houve uma tendência desse valor ser superior no tratamento com manitol (Figura 2). Concordando com isso, há uma tendência do peso seco da plântula (ou de suas partes) do tratamento com manitol ser um pouco menor do que aquele do tratamento salino, embora a análise estatística também não tenha revelado diferença significativa entre os dois tratamentos. Esses resultados sugerem que o estresse causado pelo manitol sobre a mobilização das reservas do cotilédone, tenha sido um pouco mais severo do que aquele imposto pelo NaCl.

Os comprimentos da raiz principal, da parte aérea e da plântula no controle, foram estatisticamente superiores aos dos outros tratamentos (Figura 3). Este resultado foi concorde com os de pesos fresco e seco (Figura 1 e 2) e demonstra

FIGURA 2 - Pesos fresco e seco de cotilédones de plântulas de feijão de corda pitiúba, com 7 dias de germinação em água destilada () e em soluções i osmótica (-4,6 bar) de NaCl () e de manitol (). As mesmas letras sobre cada um dos conjuntos de histogramas, indicam médias que não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

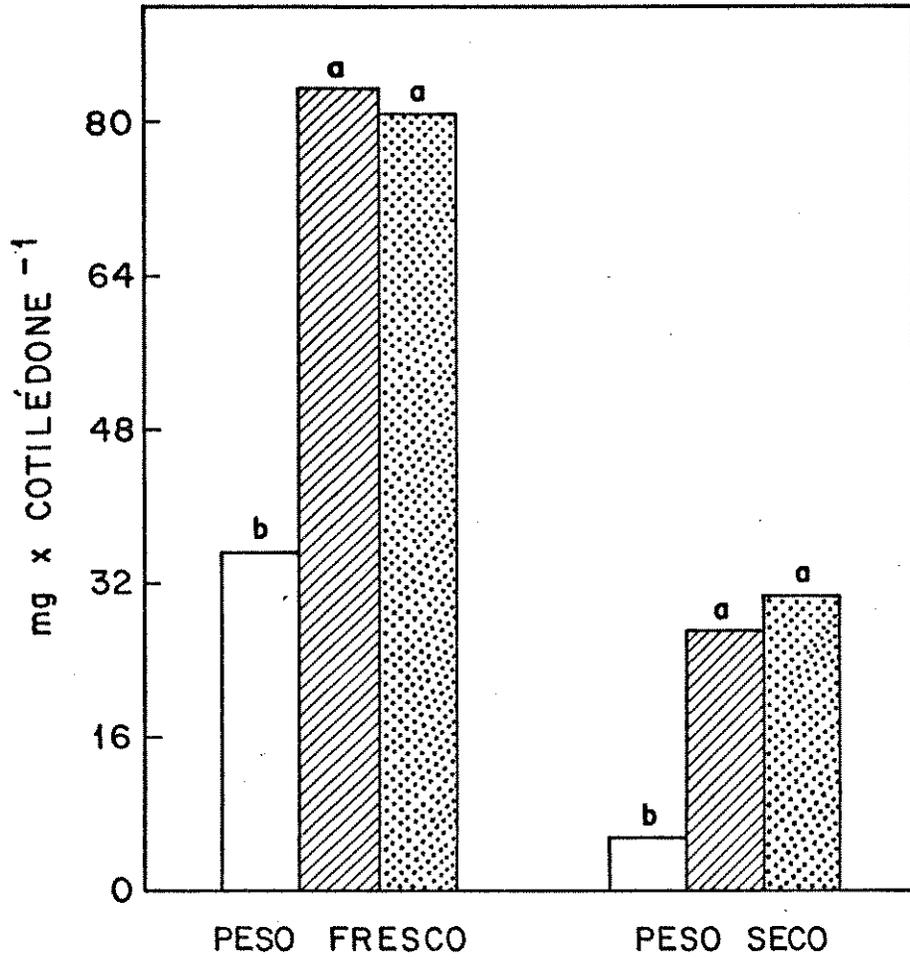
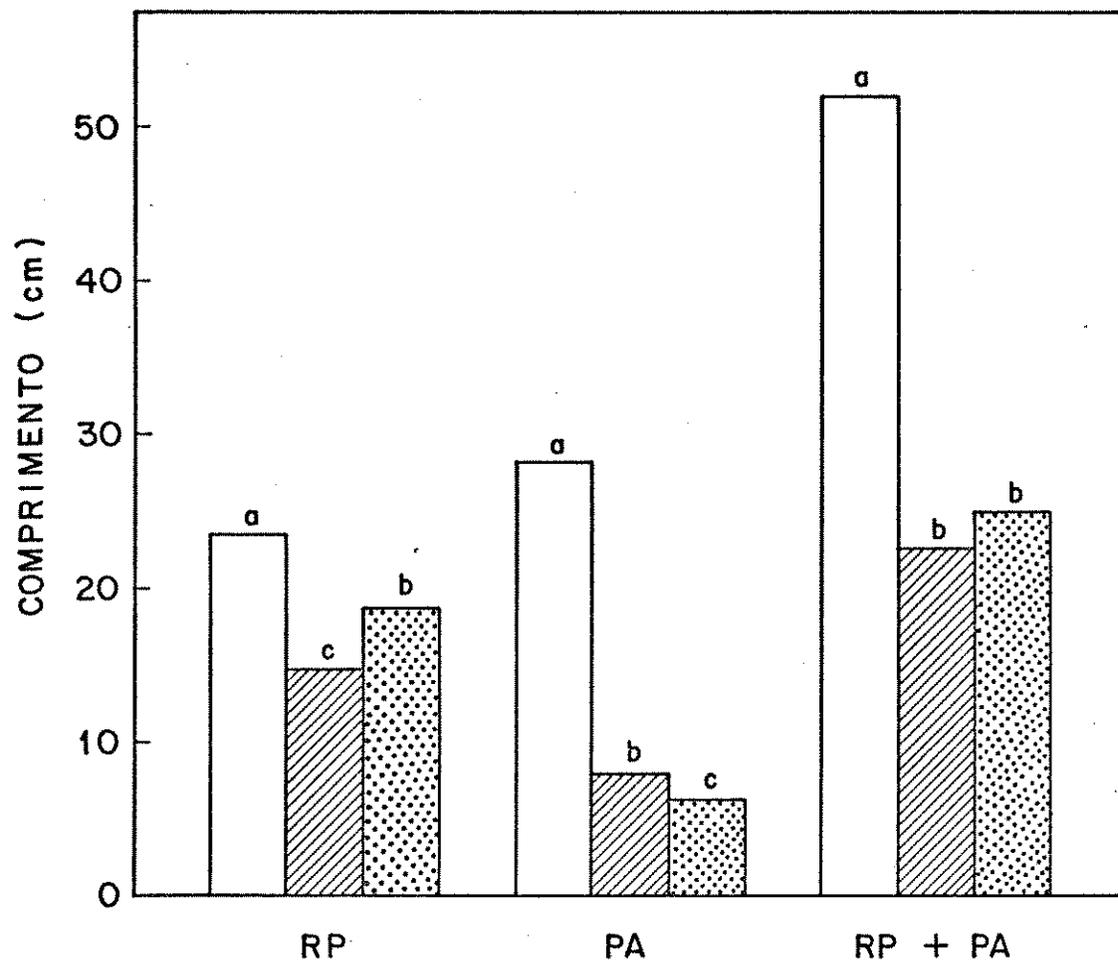


FIGURA 3 - Comprimento da raiz principal (RP), da parte aérea (PA) e da plântula (RP + PA) de feijão de corda pitiúba, com 7 dias de germinação em água destilada () e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl () e de manitol (). As mesmas letras sobre cada um dos conjuntos de histogramas, indicam médias que não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



o efeito inibitório do NaCl e do manitol sobre o crescimento das plântulas. Resultados semelhantes foram observados por outros autores quando estudaram os efeitos do NaCl e do manitol na germinação de sementes e no desenvolvimento das plântulas (UHVITS, 1946; PRISCO & O'LEARY, 1970a; MACHADO et al., 1976; PRISCO & VIEIRA, 1976; SHEORAN & GARG, 1978; GOMES FILHO & PRISCO, 1978; GOMES FILHO et al., 1983; KAWASAKI et al., 1983).

É interessante ressaltar, que embora o peso fresco do sistema radicular no tratamento com manitol tenha se apresentado inferior ao do tratamento salino, o comprimento da raiz principal foi maior nesse tratamento (Figuras 1 e 3). Tais resultados foram concordantes com as observações visuais das plântulas durante a coleta do experimento, onde as raízes principais oriundas do tratamento com manitol se apresentaram mais compridas e menos espessas que as do tratamento salino. Como o crescimento em volume e/ou em comprimento de um órgão está diretamente relacionado com a quantidade de água absorvida, e conseqüentemente com a turgescência celular (BOYER, 1970), era de se esperar que a raiz principal se apresentasse mais comprida no tratamento salino, em razão do maior peso fresco apresentado pelo sistema radicular nesse tratamento. É possível, por conseguinte, que o processo de divisão celular, que também está diretamente envolvido com o crescimento de um órgão, tenha sido afetado (HSIAO, 1973). Pode-se supor, que a salinidade tenha causado uma maior alteração na relação citocinina/auxina, responsável pelo processo de alongamento e divisão celular, e daí o crescimento da raiz principal tenha sofrido uma maior redução. Em suporte a esta idéia, O'LEARY (1971) observou uma possível inibição na biossíntese de cito

cinina nas raízes provocada pela salinidade.

Ao contrário do comportamento observado nas raízes, o comprimento da parte aérea das plântulas do tratamento salino foi superior ao das plântulas do tratamento com manitol (Figura 3). Este resultado foi concordante com aquele apresentado na Figura 1, onde o peso fresco da parte aérea do tratamento salino foi superior ao do tratamento com manitol.

Embora as medidas de comprimento efetuadas nas partes individuais das plântulas tenham revelado diferenças significativas entre os tratamentos salino e com manitol, não foi observada diferença significativa entre os comprimentos totais das plântulas nos dois tratamentos (Figura 3). Este fato ressalta, que a análise do crescimento, quando realizada nas várias partes da plântula, é mais indicada para apontar diferenças entre tratamentos, que aquela feita apenas sobre a plântula inteira.

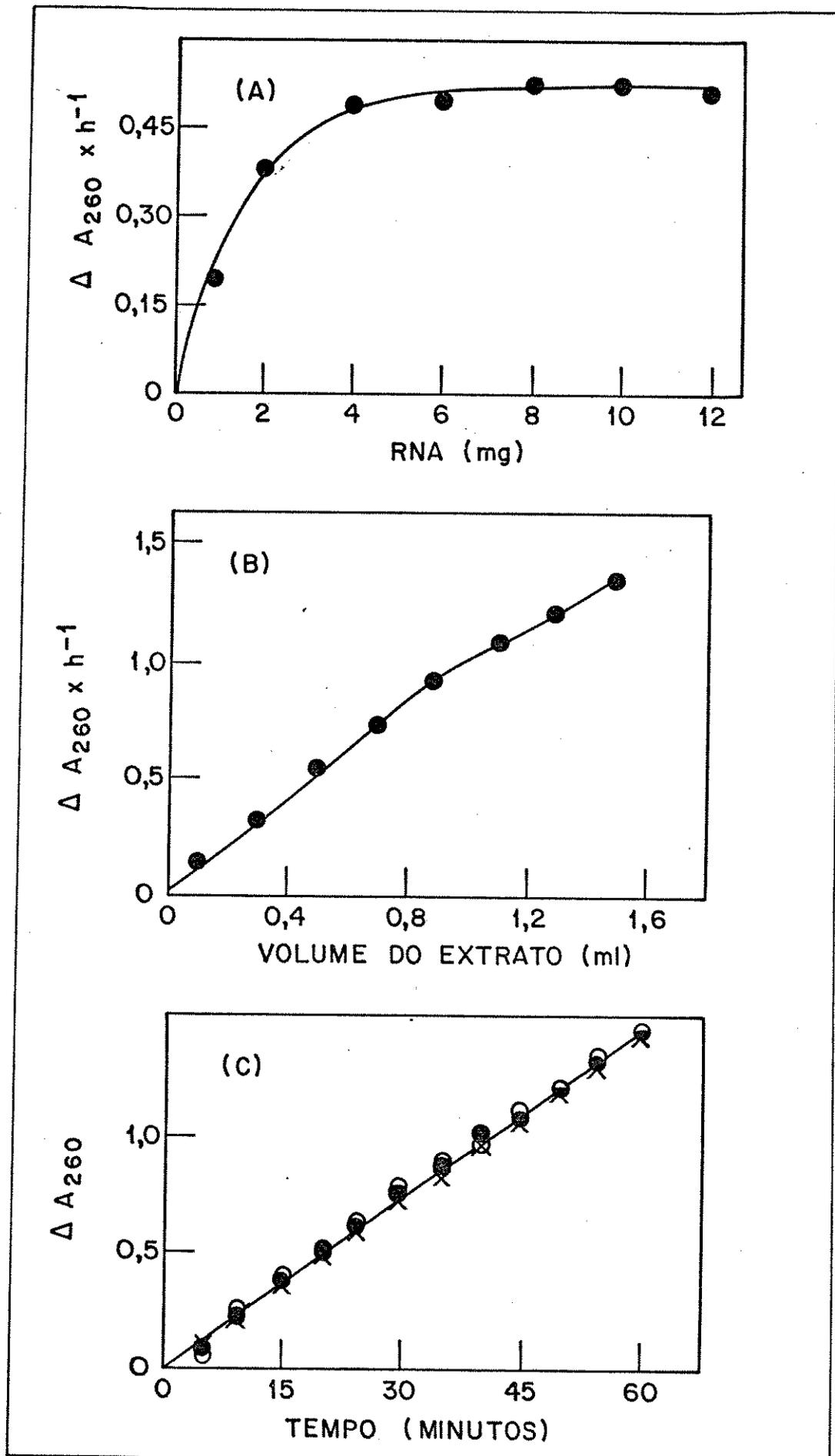
2. Atividade ribonucleásica.

2.1. Condições apropriadas de ensaio.

O estudo da atividade ribonucleásica durante a germinação foi precedido por alguns experimentos, realizados para garantir que a enzima seria ensaiada em condições ótimas de reação. Esses experimentos foram efetuados em extratos de cotilédones provenientes de plântulas de feijão com 5 dias após a semeadura em água destilada. O pH do ensaio foi 5,2 como previamente estabelecido por GOMES FILHO et al. (1983). Para que a reação enzimática se processasse em excesso de substrato, de

terminou-se a relação enzima-substrato (Figura 4 A). Da curva obtida, ficou estabelecida a relação de 10 mg de substrato (RNA) para 1,0 ml de extrato diluído 1:10 (v:v) com tampão citrato-Na, 0,05 M, pH 5,2, sendo o volume final de reação 5,0 ml. A atividade ribonucleásica aumentou em função das crescentes quantidades de extrato (enzima bruta) na mistura de reação, porém só houve linearidade até um valor de $\Delta A_{260} \times h^{-1}$ de aproximadamente 0,900 (Figura 4 B). Em vista disso, todas as medidas de atividade enzimática foram feitas a partir de leituras de absorbância que resultassem em $\Delta A_{260} \times h^{-1}$ menores ou iguais a 0,900. A estabilidade da enzima foi testada com relação às soluções tampões de citrato-Na, MES-Na e acetato-Na, todos a 0,05 M e pH 5,2 (Figura 4 C). Como pode ser observado, a atividade ribonucleásica foi praticamente a mesma nos três tampões testados e aumentou linearmente com o tempo de reação. Este resultado indica que a enzima é estável nos tampões testados, pelo menos até 60 minutos de reação, diferentemente do encontrado por SODEK (1968) em folhas de trigo, que observou uma inibição da enzima pelo citrato. Embora qualquer dos tampões testados possa ser usado para ensaios de atividade com a RNase, o citrato por possuir propriedades quelantes, apresenta uma vantagem sobre os outros. Desta forma, decidiu-se pelo citrato como tampão do ensaio, por ele poder funcionar como um protetor da enzima contra eventuais impurezas (metais pesados) existentes na mistura de reação. Em alguns casos, e por razões que serão justificadas posteriormente, o ensaio de atividade ribonucleásica foi realizado em tampão acetato.

FIGURA 4 - Condições apropriadas de ensaio com a RNase de cotilédones de plântulas de feijão de corda pitiúba, com 5 dias após a semeadura em água destilada. (A): Curva de atividade ribonucleásica em função de quantidades crescentes de substrato (RNA). (B): Curva de atividade ribonucleásica, em função de quantidades crescentes de extrato (enzima bruta). (C): Curva de atividade ribonucleásica em função do tempo de reação nos tampões citrato (●), MES (×) e acetato (○), todos a 0,05 M e pH 5,2. Em (A) e (B) a extração foi 1:10 (1 g de cotilédone para 10 ml do tampão de extração) e os extratos originais foram diluídos 1:10 e 1:5, respectivamente. Em (C), excepcionalmente, o volume final de reação foi de 20 ml e a concentração final em RNA de 0,4%. Os valores representam médias de 3 ensaios.

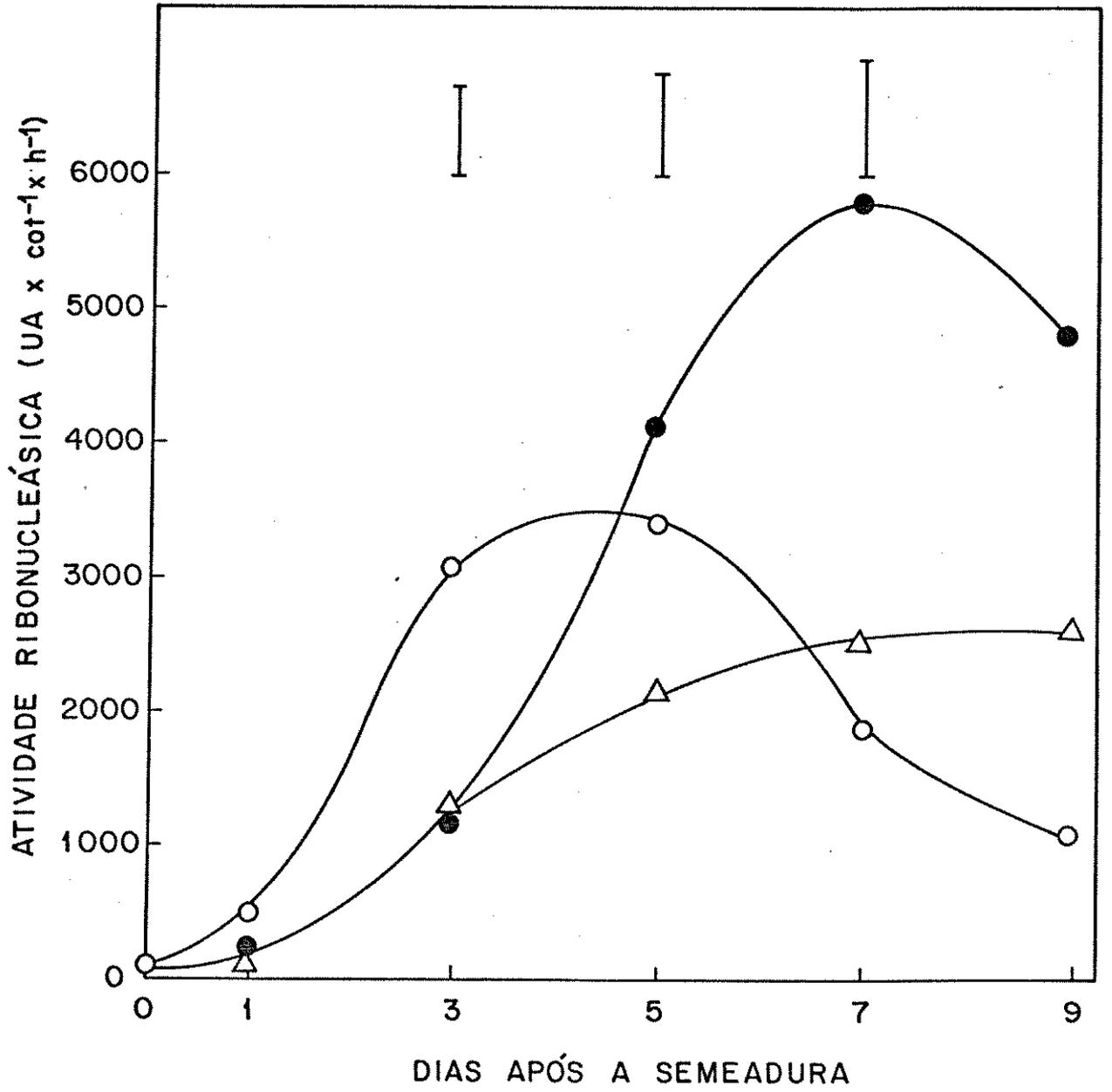


2.2. Atividade ribonucleásica em condições de estresse hídrico e salino.

A atividade ribonucleásica total nos cotilédones do tratamento controle (Figura 5), aumentou até o 3º dia após a sementeira, permanecendo praticamente constante até o 5º dia, quando começou a decrescer. No último dia do período estudado, atingiu um valor 10,4 vezes maior do que aquele apresentado no dia zero. Este comportamento da RNase, juntamente com a observação de que o nível de RNA na semente quiescente é normalmente alto (BEEVERS & GUERNSEY, 1966; PALMIANO & JULIANO, 1972; VIEIRA, 1975; GOMES FILHO et al., 1983) e decresce à medida que o processo germinativo se desenvolve, sugere que esta enzima é ativada e/ou sintetizada *de novo*, pelo menos até o 3º dia após a sementeira (VIEIRA, 1975; GOMES FILHO et al., 1983).

Nos cotilédones de plântulas do tratamento salino, a atividade ribonucleásica total cresceu até o 7º dia após a sementeira, decrescendo em seguida até o último dia do período estudado, quando acusou um valor 42,9 vezes maior do que o apresentado no dia zero (Figura 5). Por outro lado, esta mesma atividade determinada nos cotilédones de plântulas do tratamento com manitol se mostrou crescente até o último dia do experimento, quando atingiu um valor 23,5 vezes maior do que o observado no dia zero (Figura 5). A atividade ribonucleásica total, nos cotilédones do controle, se mostrou superior àquela do tratamento salino até o 3º dia após a sementeira, e superior àquela do tratamento com manitol até o 5º dia após a sementeira (Figura 5). Todavia, depois do 5º dia após a sementeira

FIGURA 5 - Atividade ribonucleásica total de extratos de cotilédones de sementes de feijão de corda pitiúba semeadas em água destilada (O), e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl (●) e de manitol (Δ). As barras verticais sobre os pontos, representam os valores de DMS.



dura, a atividade ribonucleásica total nos cotilédones do tratamento salino foi superior à do controle. Fato idêntico aconteceu com a atividade ribonucleásica no tratamento com manitol, sendo, contudo, que ela só foi superior àquela do controle depois do 7º dia após a semeadura (Figura 5). Estes resultados sugerem, que a presença de NaCl ou de manitol (ambos a -4,6 bar) no meio de germinação das plântulas, retarda a síntese e/ou ativação da RNase.

No entanto, é conveniente ressaltar que no caso específico do tratamento com o NaCl, o aumento observado na atividade ribonucleásica a partir do 5º dia de germinação foi muito elevado para que possa ser explicado apenas como um simples atraso da curva de atividade neste tratamento com relação àquela do controle (Figura 5). Além disso, apesar de até o 3º dia após a semeadura as curvas de atividade nos tratamentos salino e com manitol não diferirem, do 5º dia em diante, a atividade ribonucleásica total para o tratamento salino foi indiscutivelmente superior à do tratamento com manitol. Este fato demonstra a existência de um efeito específico do NaCl, *in vivo*, sobre a RNase. Pode-se supor que, até o 3º dia após a semeadura, quando as curvas de atividade dos tratamentos salino e com manitol são iguais, haja uma predominância do fator osmótico, porém, a partir daí começa a predominar outros fatores, que seriam devidos à presença do sal no interior da célula. Entretanto, a escassez de informações a respeito da compartimentalização dos íons e/ou da RNase a nível celular nos cotilédones, dificulta um melhor esclarecimento da questão.

As medidas de peso fresco e de comprimento efetuadas nas plântulas utilizadas para a determinação da atividade ri

bonucleásica total (Figura 6) mostram que a presença de NaCl ou de manitol no meio de germinação diminui a absorção d'água e reduz o crescimento das plântulas. Estes resultados foram concordantes com aqueles apresentados nas Figuras 1 e 3 sobre o crescimento das plântulas. Também a curva de peso fresco dos cotilédones com a germinação (Figura 7) sugere que as presenças do NaCl e do manitol, *in vivo*, inibem a mobilização das reservas desses órgãos, concordando desta forma com o resultado apresentado na Figura 2. De um modo geral, as diferenças nos crescimentos das várias partes das plântulas dos tratamentos salino e com manitol (Figura 6) tornaram-se mais evidentes somente após o 5º dia, enquanto que aquelas em atividade ribonucleásica tornaram-se mais evidentes logo após o 3º dia de germinação (Figura 5). Além disso, pode-se observar que as diferenças em crescimento das plântulas dos tratamentos com NaCl e manitol, entre os 3º e 9º dias após a sementeira, foram percentualmente inferiores às das atividades enzimáticas neste mesmo período (Figuras 5 e 6). Dessas observações pode-se concluir que as alterações em atividade da RNase, causadas pelo estresse hídrico e salino, foram maiores e mais precoces que aquelas sobre o crescimento das plântulas.

A atividade ribonucleásica específica nos cotilédones do tratamento controle cresceu até o 5º dia após a sementeira, quando então começou a decrescer, atingindo no 9º dia um valor 22,9 vezes maior do que o apresentado no dia zero (Figura 8). O comportamento da atividade ribonucleásica específica foi concordante com o da atividade total, sugerindo que a RNase é uma enzima que, ou sofre síntese *de novo*, ou é ativada. Esta questão foi aqui investigada e posteriormente será discutida.

FIGURA 6 - Medidas de peso fresco do sistema radicular (SR), da parte aérea (PA) e da plântula (SR + PA) e de comprimento da raiz principal (RP), da parte aérea (PA) e da plântula (RP + PA) de feijão de corda pitiúba, semeada em água destilada (O) e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl (●) e de manitol (Δ).

FIGURA 7 - Peso fresco de cotilédones durante a germinação de sementes de feijão de corda pitiûba semeadas em água destilada (O) e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl (●) e de manitol (Δ).

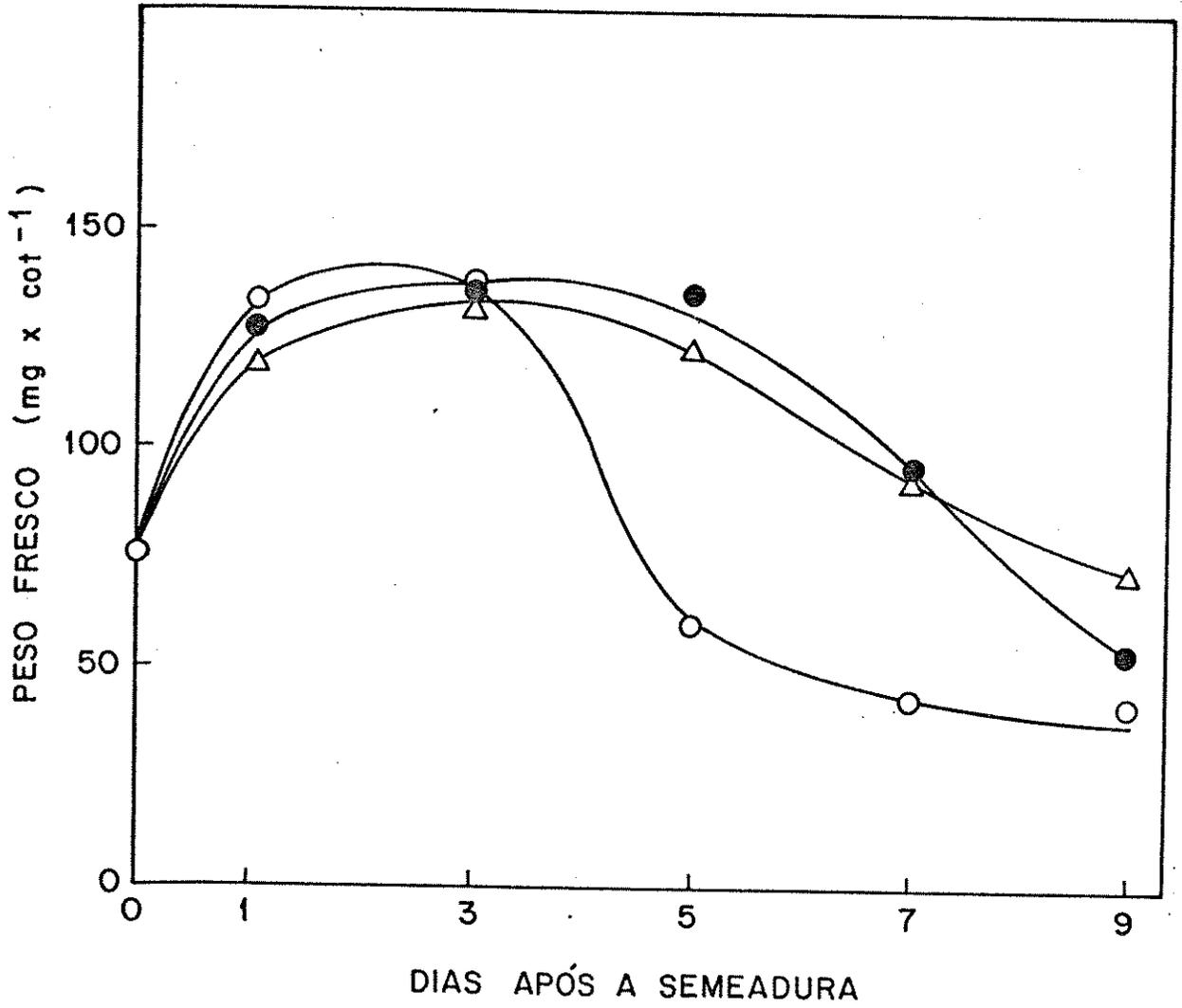
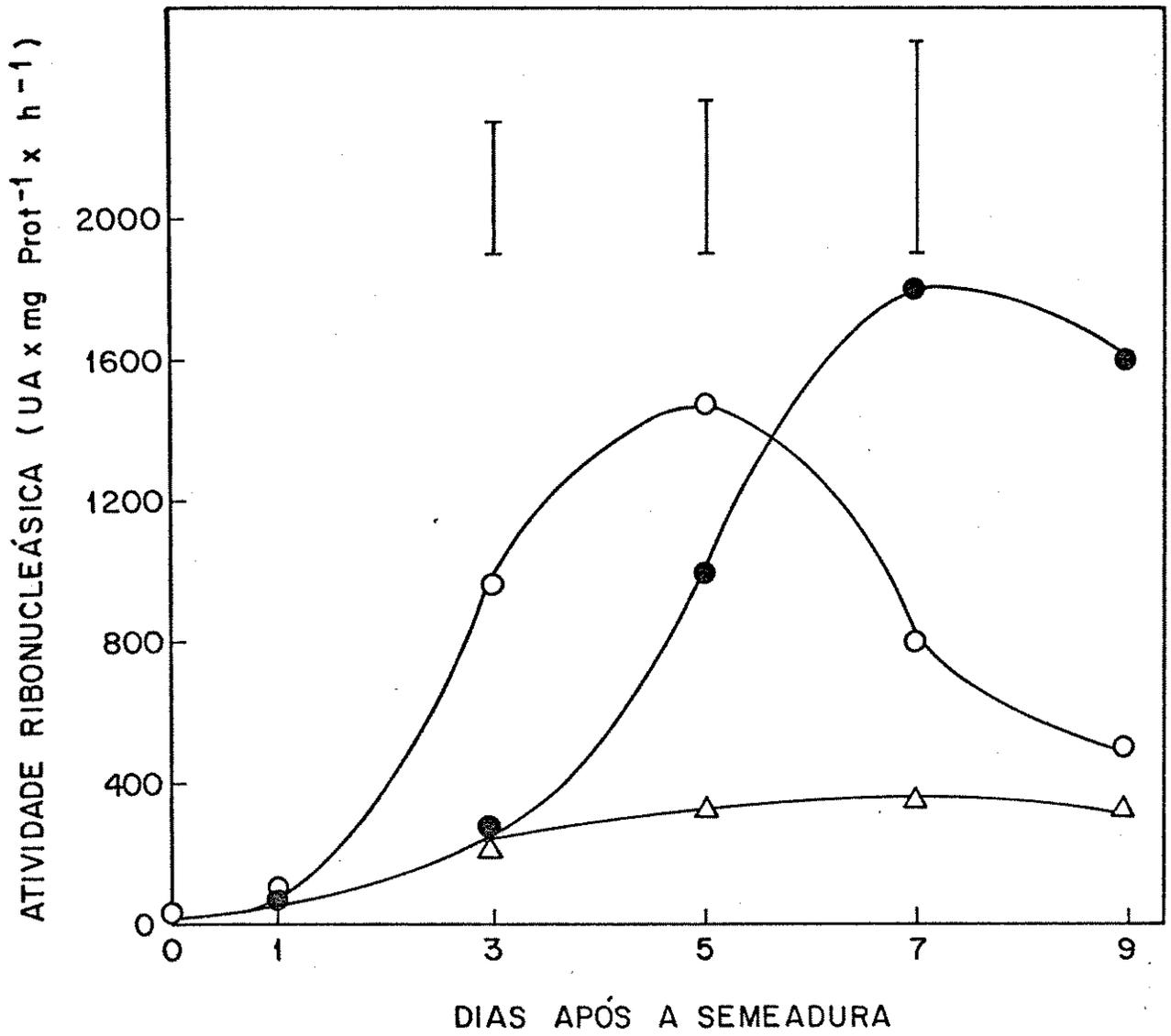


FIGURA 8 - Atividade ribonucleásica específica de extratos de cotilédones de sementes de feijão de corda pitiúba semeadas em água destilada (O) e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl (●) e de manitol (Δ). As barras verticais sobre os pontos representam os valores de DMS.



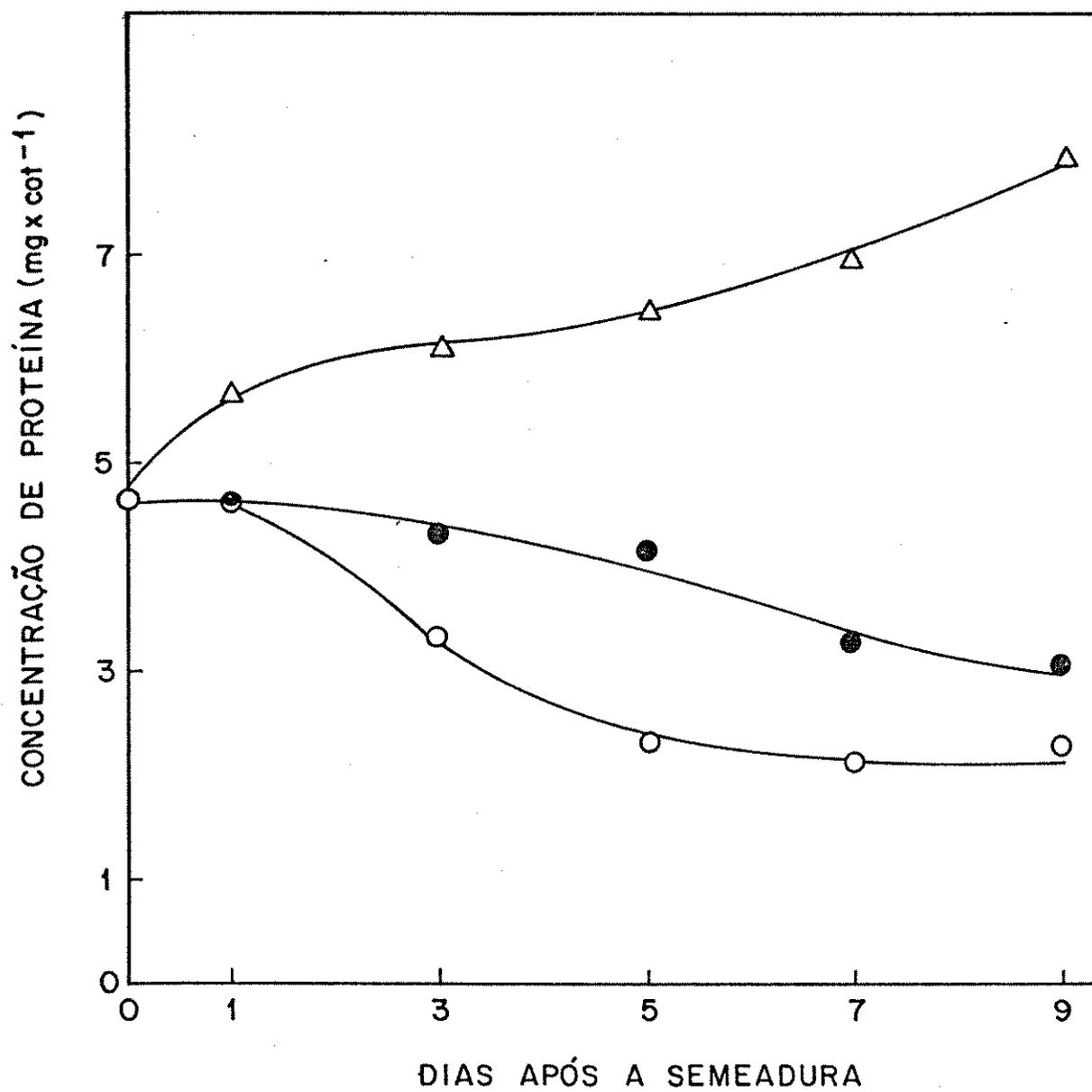
Os valores de atividade ribonucleásica específica, tanto em cotilédones derivados do tratamento salino como naqueles do tratamento com manitol, apresentaram-se crescentes até o 7º dia, quando então permaneceram praticamente constantes até o 9º dia após a semeadura (Figura 8). Todavia, neste dia, enquanto que a atividade ribonucleásica específica no tratamento salino foi 73,6 vezes maior do que a observada para o dia zero, aquela correspondente ao tratamento com manitol foi de apenas 14,5 vezes maior. Também, como pode ser notado, a atividade específica da RNase nos cotilédones de plântulas do tratamento controle foi sempre superior ou igual àquela do tratamento com manitol, e superior àquela do tratamento salino apenas entre os dias 1 e 5 após a semeadura (Figura 8). A partir do 7º dia após a semeadura a situação se inverteu, e os valores de atividades nos cotilédones do tratamento salino foram superiores aos do controle.

Os efeitos inibitórios do manitol e do NaCl sobre a atividade específica foram concordantes com aqueles observados sobre a atividade total, e reforçam a idéia de que esses agentes osmóticos afetam a síntese e/ou ativação da RNase (Figuras 5 e 8). A hipótese de inibição na síntese *de novo* é reforçada pelo fato de que o NaCl é conhecido como um inibidor da síntese de proteína (KAHANE & POLJAKOFF-MAYBER, 1968; PRISCO & O'LEARY, 1970 b), e que o NaCl, *in vitro*, causa apenas uma pequena inibição da RNase (GOMES FILHO & PRISCO, 1978), insuficiente para explicar os altos níveis de inibição observados *in vivo*. Resultados semelhantes sobre os efeitos do NaCl, *in vivo*, na atividade ribonucleásica nos cotilédones, foram observados por outros autores (VIEIRA, 1975; SHEORAN & GARG, 1978; GOMES FILHO *et al.*, 1983). É possível supor-se que um

baixo nível dessa enzima, no início do processo germinativo desfavoreça a etapa de mobilização das reservas de RNA nos cotilédones e, desta forma contribua, pelo menos em parte, para a inibição do processo germinativo. Por outro lado, em cotilédones de tomate destacados das plântulas, ONG (1980) observou que o estresse hídrico imposto pelo manitol causou um estímulo na atividade ribonucleásica. É possível que a discordância deste resultado com o aqui apresentado seja decorrente apenas da maneira diferente de como o estresse foi aplicado.

De maneira idêntica à observada para a atividade total (Figura 5), a atividade específica no tratamento salino não diferiu daquela do tratamento com manitol até o 3º dia após a sementeira, porém, a partir daí se mostrou claramente superior (Figura 8). Também pode ser notado que as diferenças em atividades específicas entre esses dois tratamentos foram mais acentuadas do que aquelas observadas nas atividades totais. No 7º dia após a sementeira, onde foi máxima as diferenças em atividade total ou específica entre os dois tratamentos, o valor da atividade específica no tratamento salino se apresentou cerca de 5 vezes maior do que aquele no tratamento com manitol, enquanto que o valor da atividade total, neste mesmo tratamento, foi somente cerca de 2,3 vezes maior (Figuras 5 e 8). Este fato pode ser explicado através dos valores de concentração de proteína dos extratos utilizados para determinação da atividade enzimática (Figura 9). Como pode ser visto, os valores de concentração de proteína dos extratos de cotilédones do tratamento com manitol foram superiores àqueles oriundos do tratamento salino, desde o 1º dia após a sementeira. Além disso, enquanto a curva de concentração de proteína dos extratos do tratamento salino se mostrou decrescente com a

FIGURA 9 - Concentração de proteína em extratos de cotilédones de sementes de feijão de corda pitiúba semeadas em água destilada (O) e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl (●) e de manitol (Δ). Os valores representam médias de 3 repetições provenientes de extratos diferentes. Cada extrato foi dosado em triplicata.



germinação, aquela para o tratamento com manitol se mostrou crescente. Portanto, a divergência nos comportamentos das curvas de concentração de proteína nos dois tratamentos, principalmente a partir do 5º dia após a sementeira, foi o fator responsável para que as diferenças em atividades específicas se tornassem mais acentuadas do que aquelas em atividades totais nos dois tratamentos (Figuras 5, 8 e 9).

A curva de concentração de proteína nos extratos do tratamento controle, da mesma forma que aquela do tratamento salino, se apresentou decrescente com a germinação, porém os valores de concentração de proteína foram sempre iguais ou inferiores àqueles do tratamento salino (Figura 9). Embora a concentração de proteína nesses extratos represente apenas uma parte da proteína total de reserva do cotilédone (somente a fração solúvel em pH 5,1), os comportamentos das curvas apresentadas na Figura 9 sugerem que os estresses hídrico e salino inibem a mobilização e/ou o transporte das reservas proteicas do cotilédone. Resultados semelhantes sobre os efeitos do estresse salino neste processo, foram observados por PRISCO & VIEIRA (1976), GOMES FILHO & PRISCO (1978) e CASTRO (1982).

A discrepância observada no comportamento da curva de concentração de proteína nos extratos de cotilédones do tratamento com manitol, que curiosamente se mostrou crescente com a germinação e não decrescente como observado para as curvas dos outros tratamentos, sugere que houve uma superestimação no teor da proteína (Figura 9). É possível que isso tenha ocorrido como consequência da presença exagerada de peptídeos pequenos nesses extratos, resultantes da hidrólise de proteínas de reserva que não são extraídas (principalmente naqueles ex

tratos com mais dias de germinação) e que, ao interagirem com o reagente do microbiureto, são indevidamente quantificados como proteína. Reforçando este ponto de vista observa-se que, mesmo em extratos de cotilédones do tratamento controle, ocorre uma superestimação no teor de proteína, pois a simples passagem do extrato através de uma coluna de Sephadex G-25, ou a sua diálise, reduz a concentração de proteína (resultados não apresentados). Evidentemente, pelos comportamentos das curvas de concentração de proteína, é provável que os extratos de cotilédones do tratamento com manitol sejam os que se apresentem com maiores quantidades de peptídeos pequenos. De acordo com essas considerações pode-se supor que o tratamento com manitol tenha sido o que mais afetou o transporte do hidrolisado proteico dos cotilédones para as outras partes da plântula. É possível que isto seja decorrente do fato do estresse imposto pelo manitol ter sido um pouco mais severo do que aquele com o NaCl, como sugerido pelos resultados de crescimento apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. Entretanto, não se pode descartar a hipótese da existência de um efeito específico do estresse com manitol sobre o processo de transporte das reservas. Contudo, não se encontrou na literatura pesquisada informações especificamente relacionadas com a mobilização e/ou transporte das reservas proteicas do cotilédone, em condições de estresse hídrico.

3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Tendo em vista as modificações em atividades ribonucleásicas causadas pelos estresses hídrico e salino, e de acor

do com os resultados de alguns experimentos preliminares, que mostraram a existência de isoenzimas de RNase nos extratos, levantou-se a hipótese de que a presença de NaCl ou de manitol no meio de germinação poderia provocar alterações nos níveis dessas isoenzimas. Para investigar isso determinou-se o padrão de isoenzimas de RNase nos cotilédones de plântulas dos tratamentos controle, salino e com manitol. Antes, no entanto, foram realizados alguns experimentos preliminares com a finalidade de se determinar as melhores condições para revelação das isoenzimas de RNase após eletroforese em gel de poliacrilamida.

As corridas eletroforéticas para esses experimentos foram realizadas com extratos de cotilédones de plântulas com 5 dias após a semeadura em água destilada. Inicialmente foram testadas as concentrações de 0,1, 0,2, 1,0, 4,0 e 10,0 mg/ml de RNA no meio de incubação dos géis. Resultados não apresentados revelaram que os géis após 20 minutos de incubação no RNA nas concentrações extremas de 0,1 e 10,0 mg/ml se apresentaram, respectivamente, fracamente e fortemente coloridos, depois do tratamento com azul de toluidina. Nas outras concentrações de RNA testadas algumas bandas foram evidenciadas, porém, a que revelou o maior número de bandas e melhor contraste de cor no gel foi a de 1,0 mg/ml. Em seguida, usando-se esta concentração foram testados os tempos de 10, 20, 60 e 120 minutos para incubação dos géis com RNA. Resultados também apresentados mostraram que os tempos de 10 minutos ou aqueles de 60 e 120 minutos de incubação, provocaram efeitos na coloração dos géis semelhantes aos causados pelas baixas e altas concentrações de RNA, respectivamente. Portanto, dos tempos de incubação testados o que apresentou melhor padrão de isoen

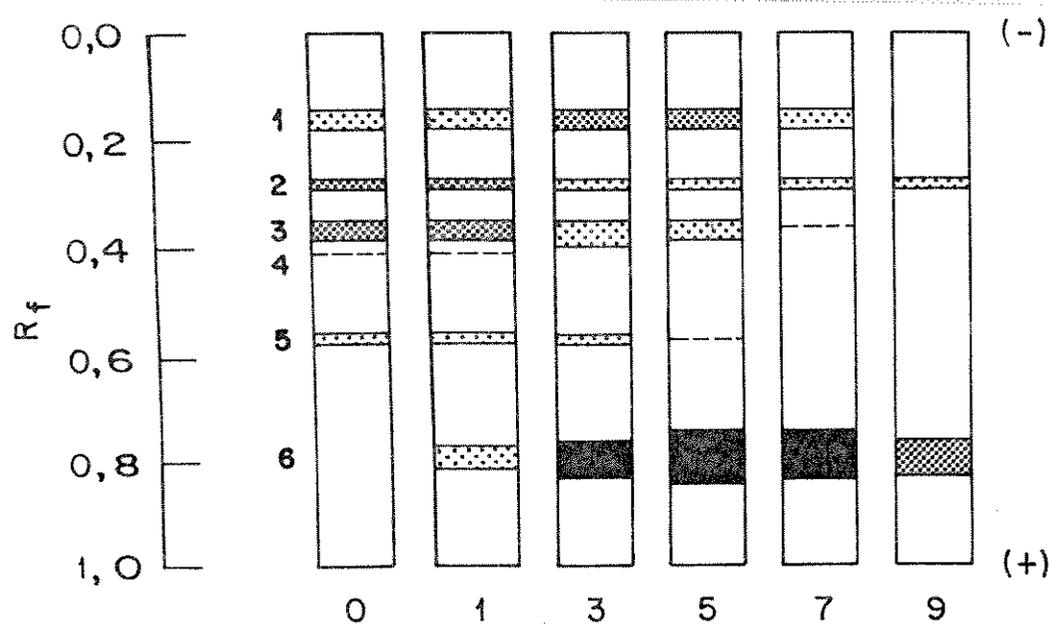
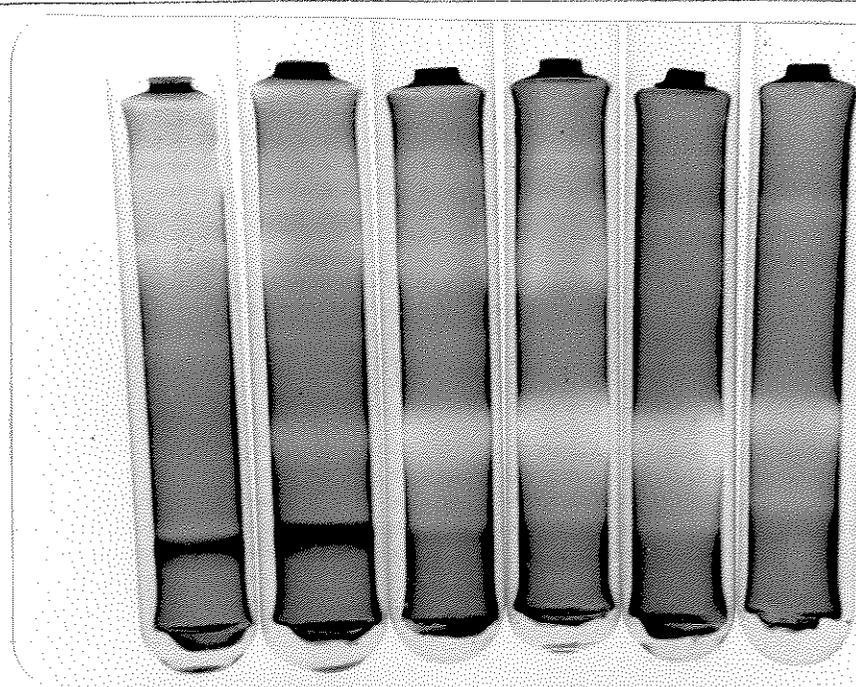
zimas de RNase foi o de 20 minutos.

De acordo com WILSON (1971), essa técnica para detecção de isoenzimas de RNase não fornece dados quantitativos a cerca das intensidades das bandas, mesmo quando elas são avaliadas através das leituras de absorbância dos géis. Por esta razão foram tomadas algumas precauções na utilização desta técnica para se obter resultados pelo menos semi-quantitativos, a fim de que fosse possível comparar-se os padrões de isoenzimas de RNase obtidos nos diversos tratamentos. Com esta finalidade, procurou-se estabelecer um tempo fixo de descoramento dos géis no ácido acético, visto que as larguras das bandas variam muito em função desse tempo. Dos vários tempos testados (resultados não apresentados) optou-se pelo de 3 horas, quando em seguida os géis foram deixados em água destilada. Estabeleceu-se também o tempo de 20 horas para permanência dos géis em água e como o máximo para realização das medidas de suas absorbâncias em 580 nm (A_{580}). Isto foi necessário porque tempos maiores de permanência dos géis em água fazem com que os picos nos gráficos de absorbância correspondentes às isoenzimas se apresentem muito largos. Após esse tempo em água os géis foram deixados em solução de $HClO_4$ 5%, que mantém as bandas de isoenzimas de RNase sem sofrerem grandes alterações por alguns dias.

3.1. Efeito do estresse salino sobre as isoenzimas de RNase.

Determinou-se inicialmente o padrão de isoenzimas de

FIGURA 10 - Isoenzimas de RNase de extratos de cotilédones de sementes de feijão de corda pitiúba semeadas em água destilada, em géis contendo quantidades equivalentes de proteínas. Os números de UA aplicados nos géis nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 9 após a semeadura foram, respectivamente, 12, 37, 485, 901, 718 e 393. Os géis foram fotografados com 27 dias após terem sido deixados em HClO_4 5%.



---   

→
INTENSIDADE

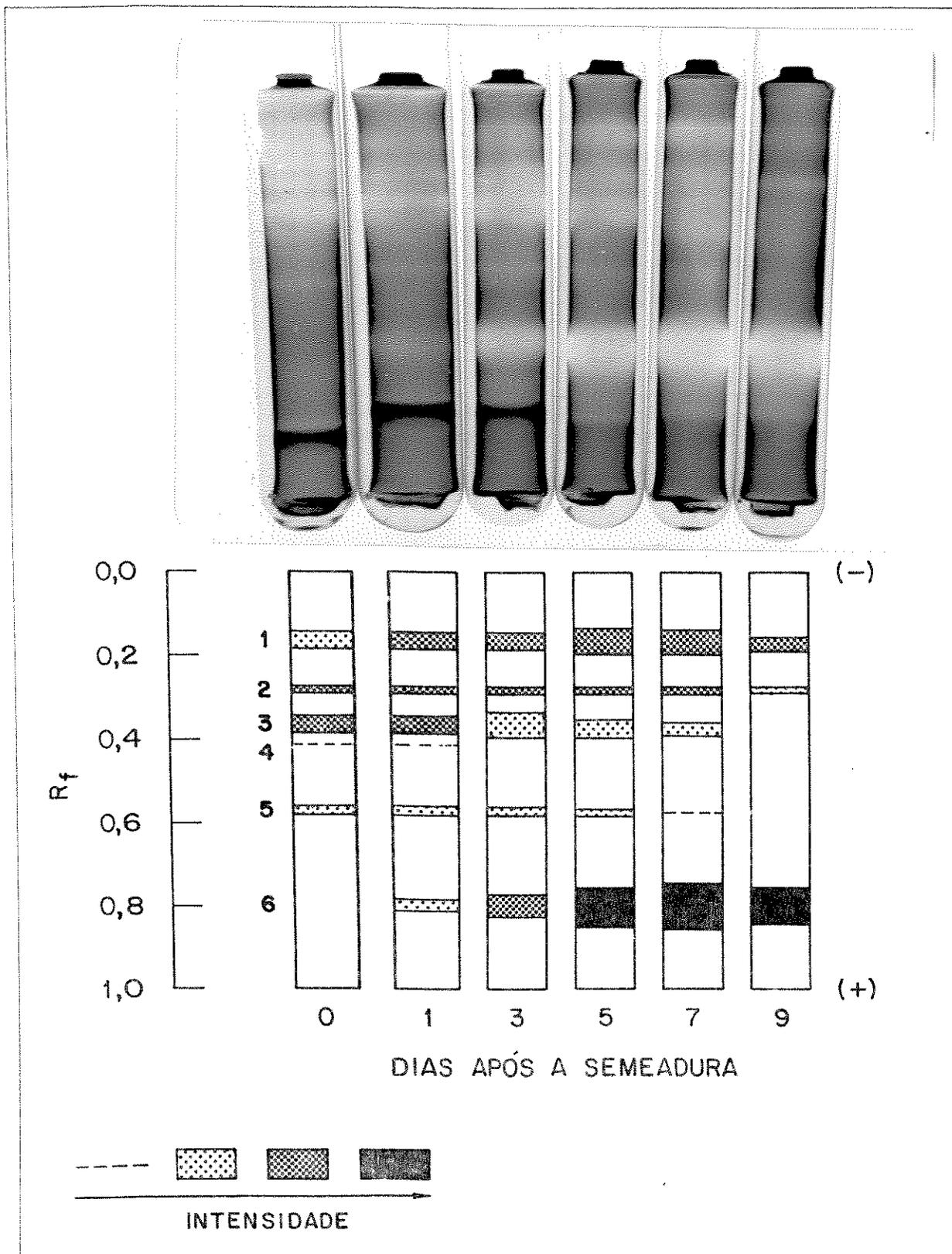
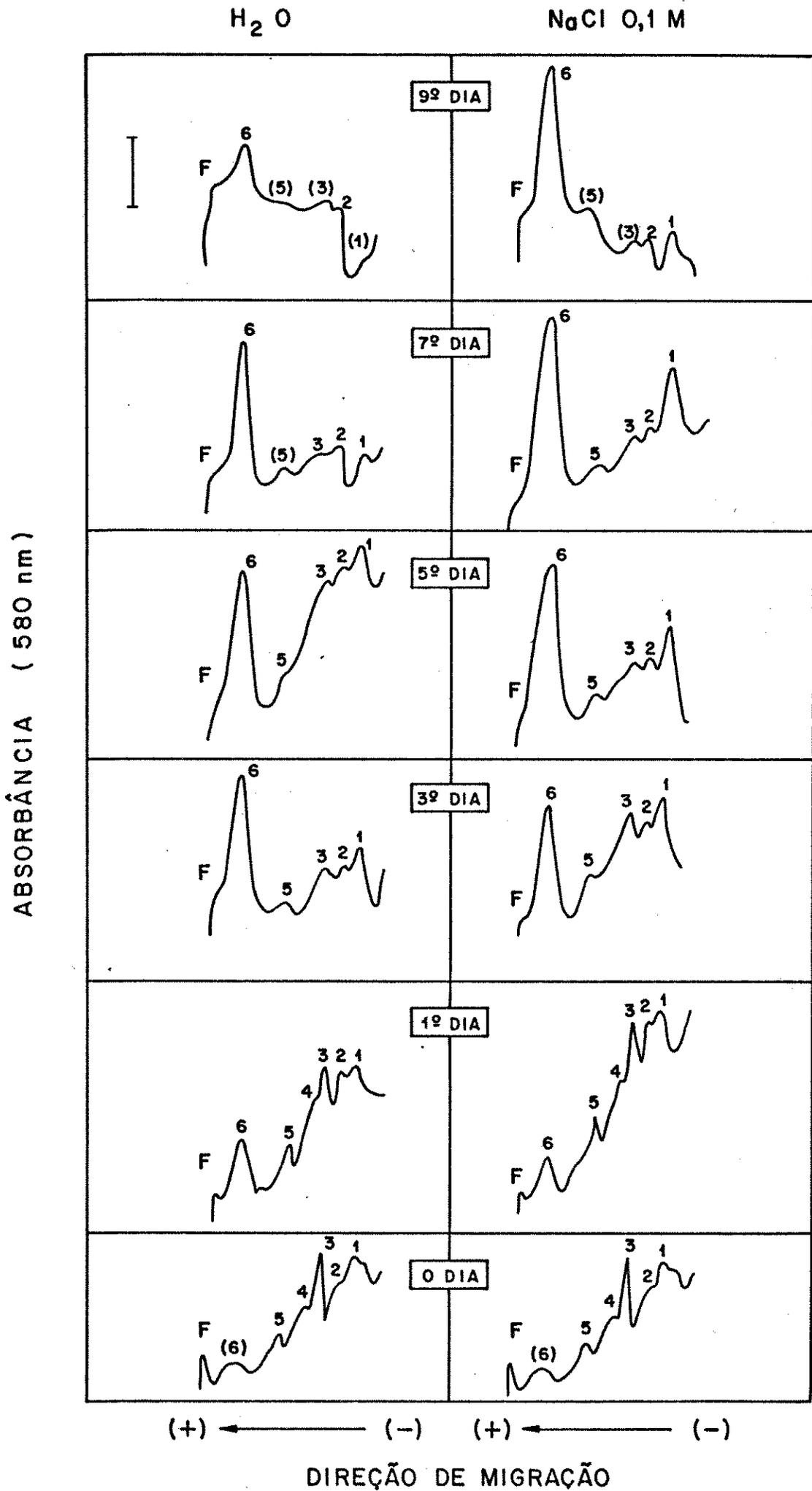


FIGURA 12 - Densitometria em 580 nm de géis semelhantes aos da Figura 10 (tratamento controle) e 11 (tratamento salino). Os números sobre os picos (zonas de menores absorbâncias), representam as bandas de isoenzimas de RNase, sendo que aqueles entre parênteses indicam as que não foram visíveis nos géis por ocasião de seus desenhos. A barra vertical no gráfico do gel de 99 dia (H_2O), corresponde a uma A_{580} de 0,100, sendo esta escala a mesma para os demais gráficos. As leituras de absorbância foram feitas entre 2 e 3 horas após os géis terem sido deixados em água destilada.



sendo mais visível no gel com extrato de cotilédones com 3 dias de germinação. Em seguida vem a banda 5, que não é mais visível no 7º dia e, finalmente, as bandas 1 e 3, que no 9º dia também não são mais visíveis. Portanto, no gel com o extrato de cotilédones de 9 dias de germinação, somente as bandas 2 e 6 são visíveis (Figura 10). É possível que o rápido desaparecimento da banda 4 tenha ocorrido devido à sua união com a banda 3, pois os R_f s dessas duas bandas são de valores muito próximos.

Nos géis contendo os extratos de cotilédones de sementes quiescentes ou de 1 dia de germinação (Figura 10), pode-se observar a presença de uma banda de cor lilás muito intensa, justamente no local onde se localiza a frente da corrida contendo o azul de bromofenol. Mesmo em corridas eletroforéticas feitas com os extratos sem conterem este indicador, observou-se também o aparecimento desta banda (resultados não apresentados), comprovando desta forma que o seu surgimento não era devido ao azul de bromofenol. Embora nos géis contendo os extratos de cotilédones de sementes quiescentes ou com 1 dia de germinação esta banda permaneça visível por vários dias, naqueles contendo os extratos de cotilédones com 3 ou mais dias após a sementeira ela logo desaparece. Um pouco acima desta banda, ou em seu lugar, evidenciou-se uma região descolorada com características semelhantes às daquelas das bandas de RNase (Figura 10). A natureza desta banda descolorada, com R_f aproximadamente igual a 1, foi investigada e, como será mostrado posteriormente, ela não é devida à presença de uma isoenzima de RNase. Por esta razão, nos gráficos de A_{580} dos géis, os picos correspondentes a esta banda se encontram representados pela letra F, como indicativo de que ela é uma banda "fal

sa" de RNase.

O padrão de isoenzimas de RNase nos extratos de co
tilédones do tratamento salino mostrou-se também com as mesmas
6 bandas evidenciadas nos extratos de cotilédones do tratament
o controle (Figuras 11 e 12). Nesses extratos a banda princi
pal foi também a que mais aumentou de intensidade com a germi
nação. No 7º dia sua intensidade foi máxima, porém a part
ir daí sofreu ligeira diminuição em intensidade (Figuras 11
e 12). O comportamento desta banda foi semelhante àquele da
atividade ribonucleásica específica no tratamento salino apres
entado na Figura 8.

Uma comparação entre as bandas principais nos dois
tratamentos revela que nos dias 1 e 3 após a semeadura, aquel
a no tratamento salino se apresenta nítidamente com men
or intensidade (Figuras 10, 11 e 12). Nos extratos de coti
lédones de 5º dia após a semeadura, as bandas principais dos
tratamentos controle e salino apresentaram-se com intensidades
praticamente iguais. Contudo, nos extratos de cotilédones com
7 e 9 dias após a semeadura, a banda principal no tratamento
salino mostrou-se com intensidade bastante superior àquela do
tratamento controle (Figuras 10, 11 e 12). Essas variações em
intensidades das bandas principais, entre os tratamentos cont
role e salino, são semelhantes àquelas entre as atividades ribi
onucleásicas totais e específicas entre os dois tratamentos
(Figuras 5 e 8). Este fato sugere que a atividade da isoenzima
de RNase correspondente à banda principal representa uma
parcela preponderante de toda a atividade ribonucleásica do ext
rato. As bandas secundárias do tratamento salino apresentara
m-se com pequenas variações em intensidades e, de um modo ge

ral, mostraram-se com tendência de se tornarem mais fracas ou de desaparecerem com a germinação (Figuras 11 e 12). As bandas 2 e 4 desse tratamento se apresentaram com variações de intensidades durante a germinação correspondentemente semelhantes aos das mesmas no tratamento controle (Figuras 10, 11 e 12). As bandas 3 e 5 do tratamento salino só não foram visíveis nos extratos de cotilédones de 9 dias após a sementeira. A banda 1 nos cotilédones desse tratamento, após aumentar de intensidade entre os dias 5 e 7, tem sua intensidade diminuída no 9º dia após a sementeira. Contudo, diferentemente daquela do controle, ela ainda foi visível neste dia (Figuras 10 e 11). Além disso, esta banda no tratamento salino apresentou se, de um modo geral, com intensidades maiores do que a mesma no controle.

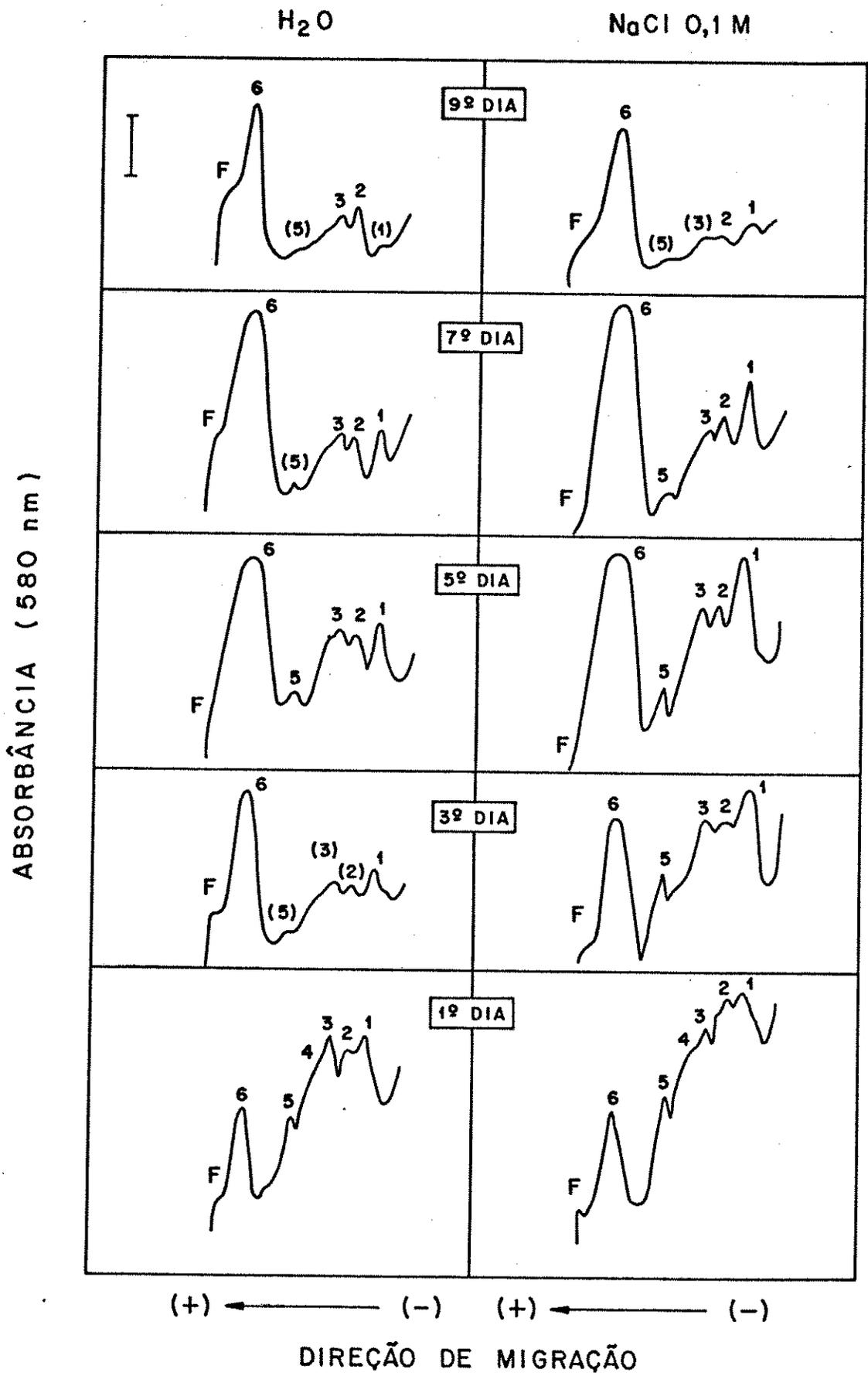
É importante ressaltar que o alto nível de atividade de ribonucleásica total ou específica, observado nos dias 7 e 9 após a sementeira no tratamento salino, (Figuras 5 e 8), não é devido ao surgimento de nenhuma nova isoenzima de RNase (Figuras 10, 11 e 12). Os resultados apresentados mostram que, simplesmente, ocorre um grande aumento no nível da isoenzima de RNase correspondente à banda principal. Por outro lado, a inibição observada na atividade ribonucleásica pelo sal, nos primeiros dias de germinação (Figuras 5 e 8), é resultante a penas de uma inibição na síntese e/ou ativação desta mesma isoenzima.

Para obter-se maiores informações a respeito do comportamento das isoenzimas de RNase com a germinação e/ou com a salinidade, realizou-se um experimento onde foram aplicadas nos géis as mesmas unidades de atividade (UA) em cada dia de

germinação, para ambos os tratamentos (Figuras 13 e 14). Como resultado, observou-se que as bandas principais nos dois tratamentos, em cada dia de germinação, tinham praticamente as mesmas intensidades, ficando as maiores diferenças por conta das bandas secundárias. De um modo geral, até o 7º dia após a semeadura, as bandas secundárias do tratamento salino se apresentaram, correspondentemente, com intensidades maiores ou no mínimo iguais às daquelas do controle. Esta situação foi mais evidente nos extratos de cotilédones com 3 dias de germinação. Como pode ser notado, além da banda 1 ter se apresentado com intensidade menor no controle, as bandas 2, 3 e 5 que são notoriamente visíveis no tratamento salino, não apareceram no controle (Figura 13). O padrão de isoenzimas de RNase no 3º dia após a semeadura no tratamento controle, apresentou-se diferente daquele observado no experimento onde foram aplicadas nos géis, quantidades equivalentes de proteínas (Figura 10). A razão disto deveu-se às diferentes quantidades de UA aplicadas em cada um dos experimentos. Naquele apresentado na Figura 10 foram aplicadas 485 UA no gel e 5 bandas apresentaram-se visíveis. Porém, no experimento apresentado na Figura 13, foram aplicadas apenas 231 UA e somente duas bandas foram visíveis. Portanto, a redução na quantidade de enzima aplicada no gel foi suficiente para que as bandas de menores intensidades deixassem de ser visíveis. Este fato mostra que nos cotilédones de 3º dia após a semeadura, a banda principal se encontra num nível muito mais elevado do que aqueles das bandas secundárias. Além do mais demonstra que o sal altera significativamente a proporção entre as bandas secundárias e a principal. No caso do 3º dia esta proporção foi maior no tra

FIGURA 13 - Isoenzimas de RNase de extratos de cotilédones de sementes de feijão de corda pitiúba semeadas em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M, em géis contendo os mesmos números de UA, em cada dia de germinação. Os números de UA aplicados nos géis nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 após a semeadura foram, respectivamente, 29, 231, 1039, 1026 e 468. Os géis foram fotografados com 8 dias a pós terem sido deixados em HClO₄ 5%.

FIGURA 14 - Densitometria em 580 nm de géis semelhantes aos da Figura 13. Os números sobre os picos (zonas de menores absorbância), representam as bandas de isoenzimas de RNase, sendo que aqueles entre parênteses indicam as que não foram visíveis nos géis por ocasião de seus desenhos. A barra vertical desenhada no gráfico do gel de 9º dia (H₂O) corresponde a uma A₅₈₀ de 0,100, sendo esta escala a mesma para os demais gráficos. As leituras de absorbância foram feitas entre 19 e 20 horas, após os géis terem sido deixados em água destilada.



tamento salino. Provavelmente isto ocorreu, não porque o sal tenha causado um grande estímulo nas intensidade das bandas secundárias, e sim porque provocou uma forte inibição na banda principal. Reforçando este ponto de vista, é no 3º dia onde a atividade ribonucleásica (Figuras 5 e 8) é mais fortemente inibida pelo sal, e conseqüentemente maior é a inibição sobre a banda principal.

Nos cotilédones de 1º dia do tratamento salino, onde a atividade ribonucleásica também se encontra inibida, há um predomínio nas intensidades das bandas secundárias 1, 2, 3 e 5 sobre as mesmas do controle, quando nos géis são aplicadas as mesmas UA de ambos os tratamentos (Figuras 13 e 14).

Nos cotilédones de 5º dia do tratamento salino, onde mesmo sendo pequenas as diferenças em atividade ribonucleásica (Figuras 5 e 8), ainda há um ligeiro predomínio nas intensidades das bandas secundárias (Figuras 13 e 14). Este fato sugere que, no sal, as bandas secundárias diminuem de intensidade numa velocidade menor do que aquela no tratamento controle.

No gel contendo o extrato de cotilédones com 7 dias de germinação no tratamento salino, onde a atividade ribonucleásica foi muito superior àquela do controle (Figuras 5 e 8), observou-se também um predomínio nas intensidades das bandas secundárias sobre aquelas no tratamento controle (Figuras 13 e 14). Obviamente essas bandas se apresentaram com maiores intensidades, mesmo quando a banda principal não se encontrava inibida. Ao contrário, é provável pelos dados de atividade ribonucleásica (Figuras 5 e 8) que ela se encontre num nível muito maior do que a mesma no controle. Este caso difere

daqueles apresentados nos dias 1 e 3 após a semeadura, onde a atividade ribonucleásica nos cotilédones do tratamento salino era menor do que aquela do controle e, ao contrário, as bandas secundárias se apresentaram com maiores intensidades no tratamento salino (Figuras 5, 8, 13 e 14). Esta situação pode ser explicada admitindo-se que, nos cotilédones de 7º dia de germinação no sal, o nível das bandas secundárias seja bem maior do que o apresentado no controle. Isto se justifica pelo fato de que, no 7º dia após a semeadura, a alta atividade no extrato de cotilédones do tratamento salino ser devido, principalmente, ao grande aumento de atividade da banda principal. Dessa forma, para que nos géis fossem aplicadas as mesmas UA de cada tratamento, esse extrato teve que ser diluído em 50% para ficar com os mesmos números de UA/ml que aquele do controle. Por conta disto, as bandas secundárias do tratamento salino também ficaram igualmente diluídas. Porém, mesmo assim, essas bandas se mostraram com intensidades maiores do que aquelas do controle, indicando, portanto, que nesse tratamento o nível dessas bandas é realmente mais baixo. Portanto, os resultados apresentados nas Figuras 13 e 14 sugerem que as bandas secundárias no controle desaparecem com uma velocidade maior do que aquela no tratamento salino.

No 9º dia após a semeadura as bandas secundárias se apresentaram com intensidades muito baixas, sendo visíveis no controle apenas as bandas 2 e 3, e no tratamento salino apenas as bandas 1 e 2 (Figura 13). O baixo nível das bandas secundárias dificulta um melhor entendimento sobre sua significação, porém confirma a observação de que o sal altera as proporções entre as isoenzimas de RNase durante a germinação.

Os resultados apresentados sobre o efeito do sal nas isoenzimas de RNase mostram que as modificações causadas são apenas de ordem quantitativa. Não observou-se, portanto, quaisquer alterações quanto ao número de isoenzimas de RNase presentes nos cotilédones. No entanto, tal alteração de ordem quantitativa no padrão de isoenzimas de RNase pode acarretar sérias modificações metabólicas, por afetar diretamente a mobilização e/ou o transporte das reservas de RNA para outras partes da plântula. É possível, ainda, que tais modificações ocorram também em outros órgãos da plântula, causando alterações nos níveis de RNA e, conseqüentemente, afetando drasticamente o processo de síntese proteica. Reforçando este ponto de vista, SHEORAN & GARG (1978) observaram que o NaCl afetou a atividade ribonucleásica não só nos cotilédones, mas também no eixo embrionário, nas raízes e nas folhas primárias.

Dos extratos utilizados para a determinação das isoenzimas de RNase foram retiradas amostras e feitas eletroforeses para detecção de proteínas (Figuras 15 e 16). Neste caso, da mesma forma que no experimento mostrado nas Figuras 10, 11 e 12, foi aplicado em cada gel as mesmas quantidades de proteína. Nos extratos de cotilédones do tratamento controle o padrão eletroforético apresentou-se com várias bandas de proteínas, que vão diminuindo gradativamente de intensidade e em número com a germinação, até desaparecerem quase completamente no final do experimento, apesar de terem sido aplicadas quantidades equivalentes de proteína (Figura 15). Caso semelhante foi encontrado por CASTRO (1982), que sugere ser isto devido à presença de peptídeos pequenos nos extratos, que são revelados como proteína pelo microbiureto, mas que logo se difundem do gel. É provável, portanto, que esses peptídeos se a

FIGURA 15 - Padrão eletroforético de proteínas de extratos de cotilédones de sementes de feijão de corda pitiúba semeadas em água destilada, em géis contendo quantidades equivalentes de proteína. O diagrama esquemático, mostrando os valores de mobilidade eletroforética (R_f) foi feito a partir de uma análise visual dos géis, 24 horas após terem sido deixados em TCA 10%, logo depois de terem sido fotografados.

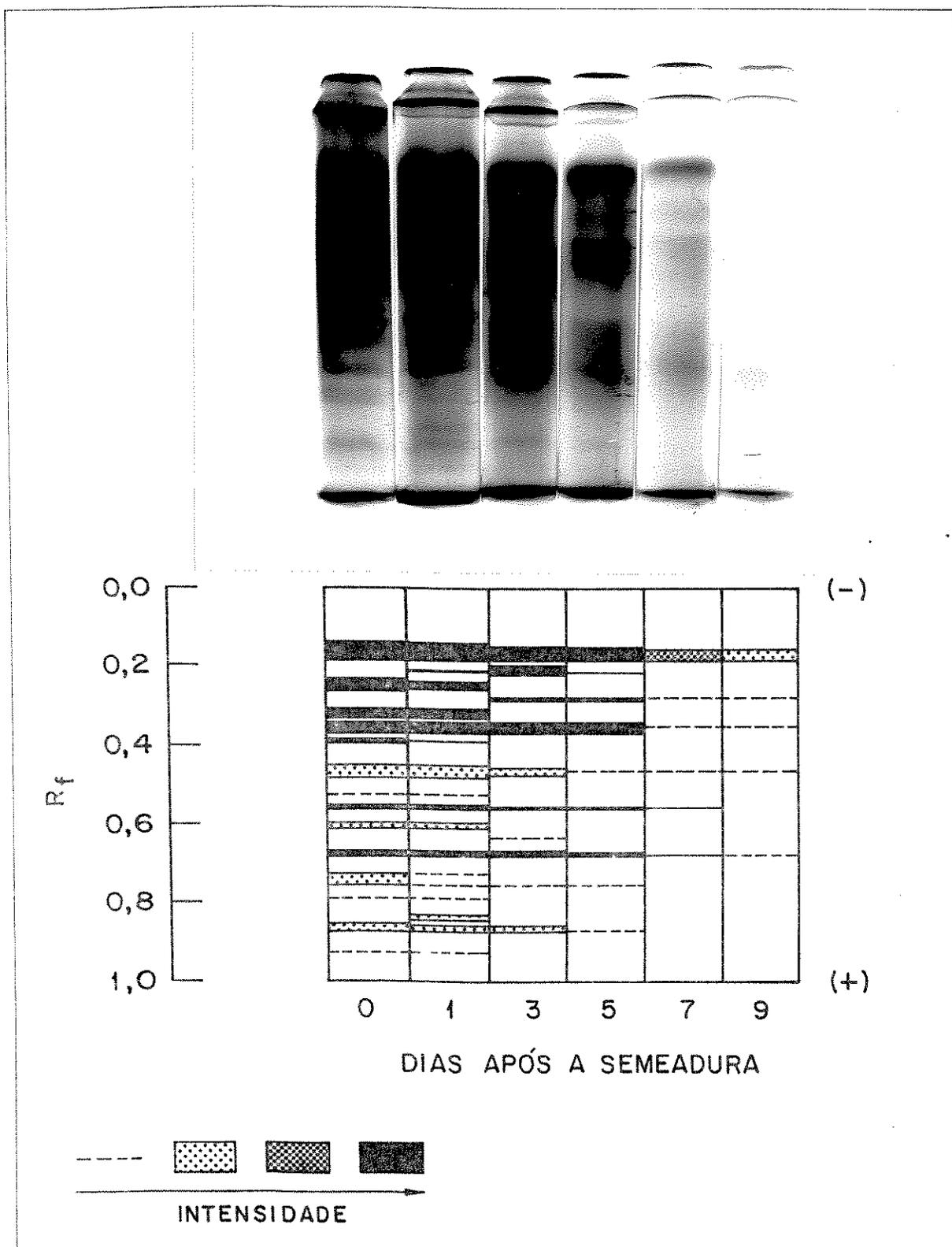
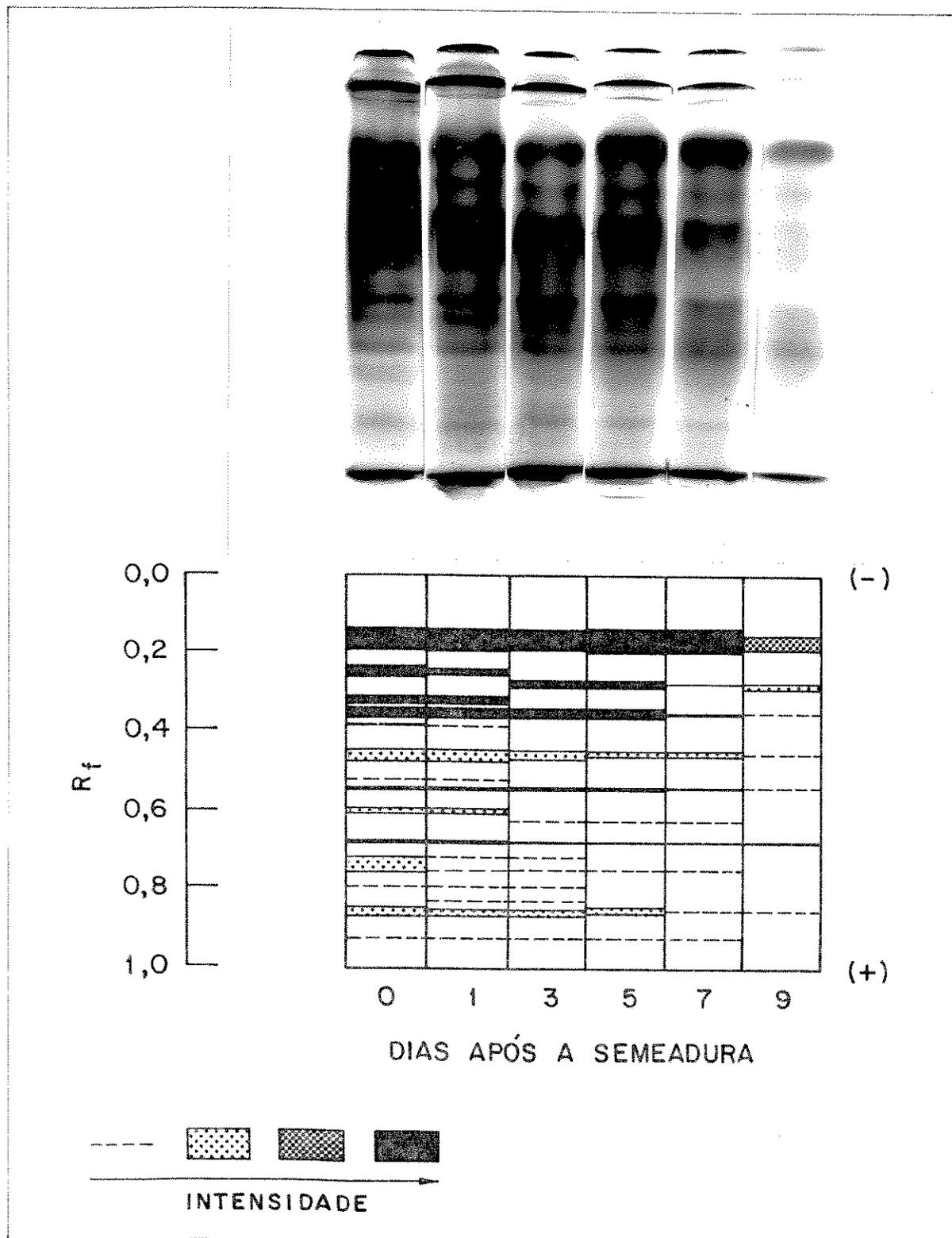


FIGURA 16 - Padrão eletroforético de proteínas de extratos de cotilédones de sementes de feijão de corda pitiúba semeadas em solução de NaCl 0,1 M, em géis contendo quantidades equivalentes de proteína. O diagrama esquemático, mostrando os valores de mobilidade eletroforética (R_f) foi feito a partir de uma análise visual dos géis, 24 horas após terem sido deixados em TCA 10%, logo depois de terem sido fotografados.



presentem em maiores quantidades nos extratos de cotilédones de plântulas com mais dias de germinação, pois, de acordo com a Figura 15, os géis contendo esses extratos foram os que se apresentaram mais fracamente coloridos.

Parece que esses peptídeos dão reação de cor com o "coomassie blue", porém logo se difundem do gel, provocando o seu descolorimento. Apoiando esta idéia observou-se, durante a execução do experimento, que os géis logo após o tratamento com o "coomassie blue" mostravam-se todos intensamente corados. Contudo, com o decorrer do tempo os géis foram se tornando mais claros, porém, aqueles contendo extratos de cotilédones com mais dias de germinação perderam cor mais rapidamente.

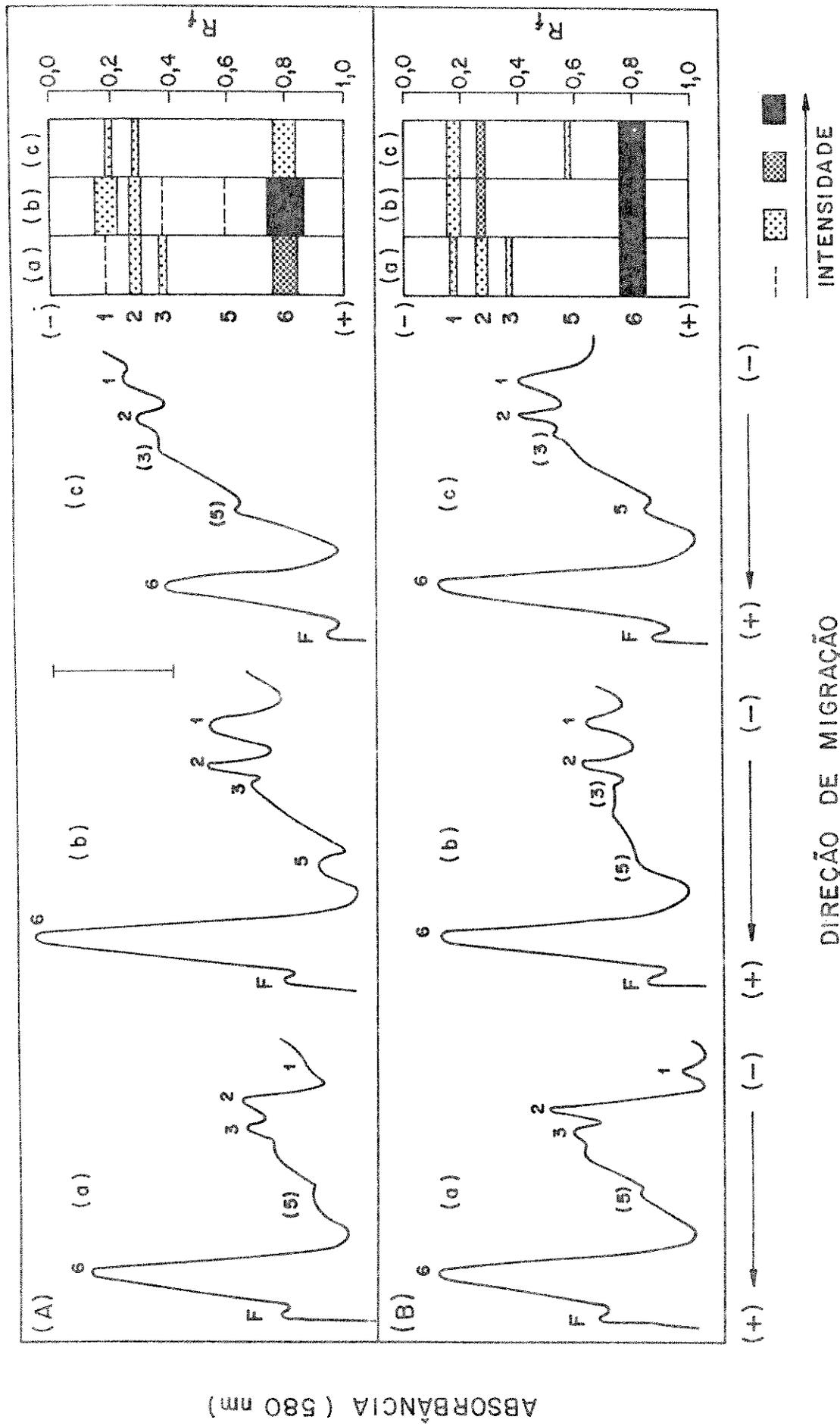
Com relação ao experimento com cotilédones do tratamento salino, observou-se a presença de várias bandas de proteínas que foram também diminuindo com a germinação. Contudo, essas bandas desapareceram mais lentamente do que as do controle, e no 9º dia após a semeadura se apresentaram em maior número (Figura 16). Resultado semelhante foi encontrado por CASTRO (1982), e sugere que a salinidade inibe a mobilização das reservas protéicas do cotilédone (PRISCO & VIEIRA, 1976; GOMES FILHO & PRISCO, 1978).

3.2. Isoenzimas de RNase em condições de estresse hídrico e salino.

Para o estudo comparativo dos efeitos dos estresses salino e hídrico sobre as isoenzimas de RNase foram utilizados extratos de cotilédones no 7º dia após a semeadura. Neste dia,

como pode ser observado nas Figuras 5 e 8, foi maior a diferença entre os valores de atividade ribonucleásica entre os dois tratamentos. Porém, como foi usado um lote de sementes diferente daquele utilizado no experimento das Figuras 10, 11 e 12, foram determinados novamente os padrões de isoenzimas de RNase, tanto no controle como no tratamento salino, a fim de poder melhor compará-los com aquele do tratamento com manitol (Figura 17). Quando foram aplicadas nos géis as mesmas quantidades de proteínas, a banda principal apresentou-se com intensidades maior e menor, respectivamente, nos tratamentos salino e com manitol (Figura 17 A). A ordem de intensidade das bandas principais nos três tratamentos foi a mesma apresentada pelas atividades específicas, no 7º dia após a semeadura (Figura 8). O baixo nível da banda principal no tratamento com manitol foi em parte devido ao baixo número de UA aplicada no gel, em consequência da baixa atividade específica do extrato. Nos tratamentos controle, salino e com manitol (Figura 17 A), foram visíveis os seguintes conjuntos de bandas secundárias respectivamente, (1, 2 e 3), (1, 2, 3 e 5) e (1 e 2). Por outro lado quando foram aplicados nos géis os mesmos números de UA, as bandas principais se apresentaram praticamente com as mesmas intensidades nos três tratamentos (Figura 17 B). Neste caso, as bandas secundárias 1 e 2 foram visíveis nos três tratamentos, enquanto que as bandas 3 e 5 foram visíveis apenas para os tratamentos controle e com manitol, respectivamente (Figura 17 B). Os resultados apresentados sugerem que o principal efeito do estresse hídrico sobre a atividade ribonucleásica, no 7º dia após a semeadura (Figuras 5 e 8), foi causar uma drástica redução na atividade da isoenzima correspondente à banda principal. Apesar das bandas secundárias terem se a

FIGURA 17 - Isoenzimas de RNase de extratos de cotilédones de plântulas de feijão de corda pitiúba com 7 dias de germinação em água destilada (a) e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl 0,1 M (b) e de manitol 0,19 m (c). Em (A) foram aplicadas quantidades equivalentes de proteína, sendo os números de UA aplicados em (a), (b) e (c), respectivamente, iguais a 265, 604 e 113 e em (B) foram aplicadas em cada gel 305 UA. Os números sobre os picos (zonas de menores absorbâncias) representam as bandas de isoenzimas de RNase, sendo que aqueles entre parênteses indicam as que não foram visíveis nos géis, por ocasião de seus desenhos. A barra vertical desenhada em (A), corresponde a uma A_{580} de 0,100, sendo esta escala a mesma para os demais gráficos. As leituras de absorbância foram feitas entre 19 e 20 horas após os géis terem sido deixados em água destilada.



ABSORVÂNCIA (580 nm)

presentado com baixas intensidades e, por conseguinte, dificultarem as análises visuais dos géis, os gráficos de A_{580} mostram com clareza que não existiram diferenças qualitativas entre as isoenzimas de RNase dos três tratamentos (Figura 17). Portanto, a principal diferença observada entre os estresses salino e hídrico sobre a atividade ribonucleásica, no 7º dia após a semeadura, foi quanto a intensidade da banda principal, que no tratamento salino se apresentou com intensidade muito maior.

3.3. Efeito do sódio dodecil sulfato (SDS) sobre as isoenzimas de RNase.

De acordo com JACOBSEN (1980), é possível que nas regiões do gel onde se localizam grandes quantidades de proteína, ocorram o aparecimento de zonas descoloridas, semelhantes àquelas produzidas pelas isoenzimas de RNase. Essas bandas de proteínas, segundo o autor, impediriam a entrada do RNA nos géis e, desta forma, imitariam o efeito produzido por uma isoenzima de RNase, não deixando formar-se o complexo colorido entre o RNA e o azul de toluidina.

Nos resultados apresentados sobre os padrões de proteína nos géis (Figuras 15 e 16), foi observada a existência de bandas com altas concentrações de proteínas, localizadas, principalmente, na região onde se encontram as bandas secundárias de isoenzimas de RNase (Figuras 10 e 11). Sendo assim, alguns experimentos foram realizados para investigar a real natureza das bandas evidenciadas como sendo de isoenzimas de RNase. Admitindo-se que um inibidor de RNase é capaz de cau

sar uma diminuição ou desaparecimento de uma banda, somente se ela for formada pela ação de uma RNase, resolveu-se testar a presença de Cu^{++} no meio de pré-incubação e/ou de incubação dos géis com RNA. Este íon foi usado na concentração de 1×10^{-3} M, onde é reconhecidamente um forte inibidor de RNase (CHEVRIER & SARHAN, 1980; PIETRZAK *et al.*, 1980; YOKOYAMA *et al.*, 1982). Observou-se que o íon Cu^{++} não foi capaz de impedir o aparecimento das bandas evidenciadas ou pelo menos de reduzir suas intensidades (resultados não apresentados). Entretanto, este resultado não foi conclusivo porque a presença de Cu^{++} no meio de reação mesmo em concentrações mais elevadas, inibiu apenas uma pequena parte da atividade ribonucleásica do extrato (resultados não apresentados). Provavelmente a razão desta baixa inibição deveu-se à presença de citrato (agente quelante) no meio de reação, pois o simples fato de se trocar o tampão de ensaio por acetato foi suficiente para tornar o Cu^{++} , mesmo na concentração de 1×10^{-3} M, um eficiente inibidor da atividade ribonucleásica (resultados não apresentados). Contudo, mesmo trocando-se o tampão de pré-incubação ou de incubação por acetato, o Cu^{++} não foi capaz de inibir o aparecimento das bandas (resultados não apresentados). Possivelmente isto aconteceu devido à presença de citrato no próprio gel de espaçamento. Portanto, os experimentos com o Cu^{++} não foram suficientes para esclarecer a questão sobre a natureza dessas bandas evidenciadas nos géis.

Prosseguindo na tentativa de esclarecer a questão, testou-se o uso de baixa temperatura no meio de incubação dos géis, como meio de prevenir a hidrólise do RNA pelas RNases e, desta forma, imitar a ação de um inibidor da enzima. A incu

bação dos géis com RNA por 20 minutos a 2°C não foi capaz de impedir o aparecimento das bandas descoloridas, supostamente causadas pelas isoenzimas de RNase (resultados não apresentados). Este resultado também não foi conclusivo, pois, ao que parece, as RNases agem sobre o RNA mesmo depois dele complexo com o azul de toluidina durante a fase de descoloramento do gel, e que foi realizada à temperatura ambiente. Esta hipótese, como será visto mais adiante, confirmou-se como verdadeira.

Finalmente, com o uso do sódio dodecil sulfato (SDS), um inibidor de nucleases (ABADOM & ELSON, 1970), chegou-se a resultados conclusivos. O SDS, além de ter funcionado com um inibidor da atividade ribonucleásica no extrato (Tabela I), causou o desaparecimento (ou diminuição de atividade) das bandas evidenciadas como sendo devidas às isoenzimas de RNase nos géis (Figuras 18 e 19). Na concentração de 1,0 mg/ml no extrato o SDS causou uma inibição de 94,7% na atividade ribonucleásica (Tabela I). Como mostrado na Figura 18, à medida que a concentração de SDS no meio de pré-incubação dos géis aumentou, as bandas foram diminuindo gradativamente de intensidades, até que nas concentrações de SDS igual ou superior a 0,8 mg/ml as bandas secundárias não foram mais visíveis. A banda principal na concentração extrema de 1,6 mg/ml de SDS se apresentou fortemente inibida (Figuras 18 e 19). Prova adicional de que o SDS inibiu a atividade ribonucleásica no gel foi obtida através de ensaios com fatias de géis pré-incubados com SDS 0,5 mg/ml, na região da banda principal. Como mostrado na Tabela II, o SDS nesta concentração inibiu 78,2% da atividade ribonucleásica. Portanto, esses resultados sugerem que as ban

TABELA I - Atividade ribonucleásica de extratos de cotilédones de plântulas de feijão de corda pitiúba com 5 dias de germinação em água destilada, tratados com concentrações crescentes de SDS por 30 minutos a 40°C. Os valores representam médias de 3 ensaios.

Concentração de SDS no extrato (mg/ml)	Atividade ribonucleásica ($\Delta A_{260} \times h^{-1}$)	Inibição da atividade (%)
0,0	1,32	0,0
0,1	1,27	3,8
1,0	0,07	94,7
10,0	0,05	96,2

- A atividade ribonucleásica do extrato não incubado a 40°C foi de 1,35.

FIGURA 18 - Isoenzimas de RNase de extratos de cotilédones de plântulas, com 5 dias de germinação em solução de NaCl 0,1 M, em função de quantidades crescentes de SDS no meio de pré-incubação dos géis. Os géis foram fotografados com 23 dias após terem sido deixados em HClO₄ 5%.

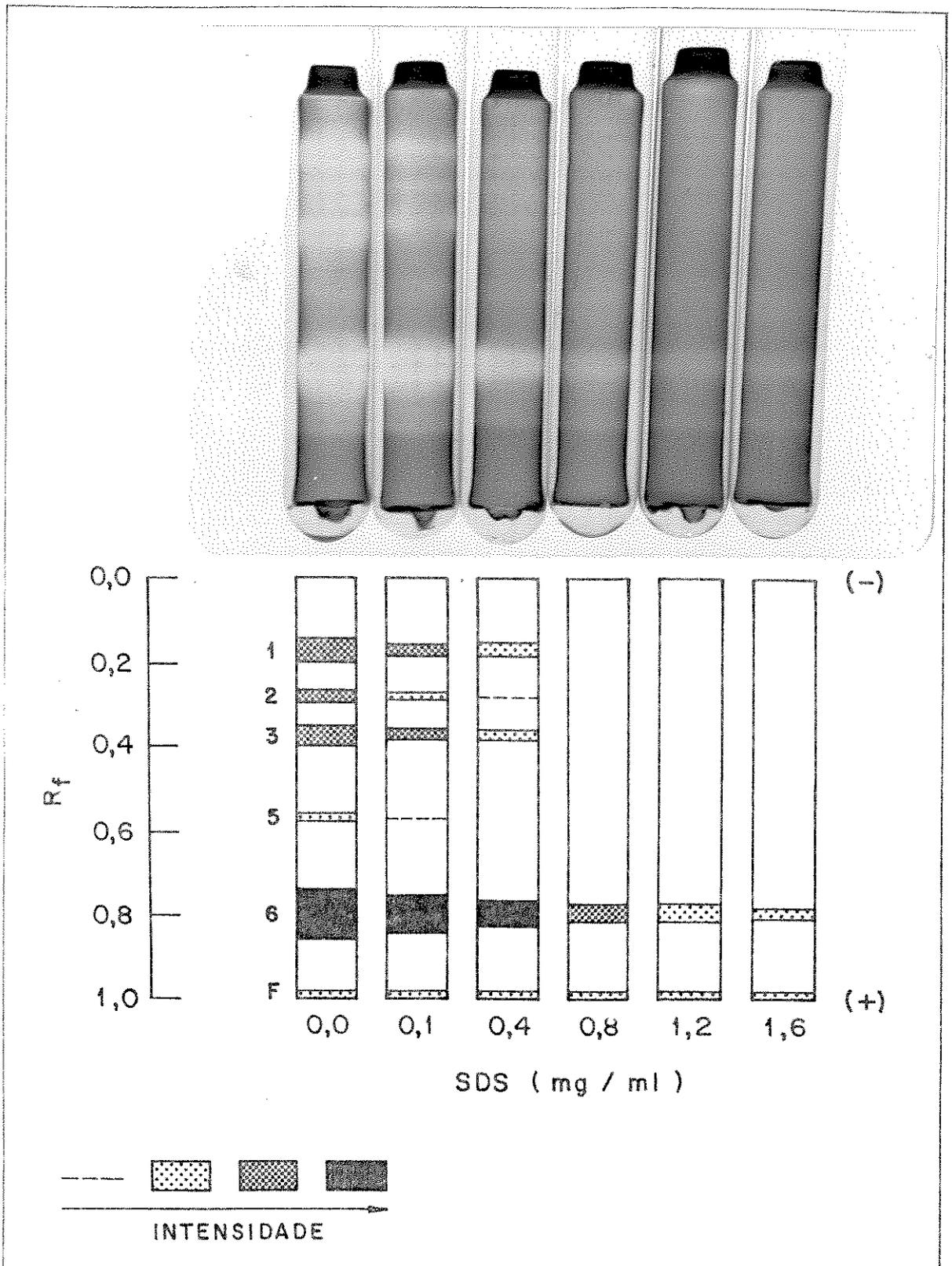


FIGURA 19 - Densitometria em 580 nm dos géis representados na Figura 18. As concentrações de SDS em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) foram, respectivamente: 0,0; 0,1; 0,4; 0,8; 1,2 e 1,6 mg/ml. Os números sobre os picos (zonas de menores absorbâncias), representam as bandas de isoenzimas de RNase, sendo que aqueles entre parênteses indicam as bandas que não foram visíveis nos géis por ocasião de seus desenhos. A barra vertical desenhada em (A) corresponde a uma A_{580} de 0,100 sendo esta escala a mesma para os demais gráficos. As leituras de absorbância foram feitas entre 19 e 20 horas após os géis terem sido deixados em água destilada.

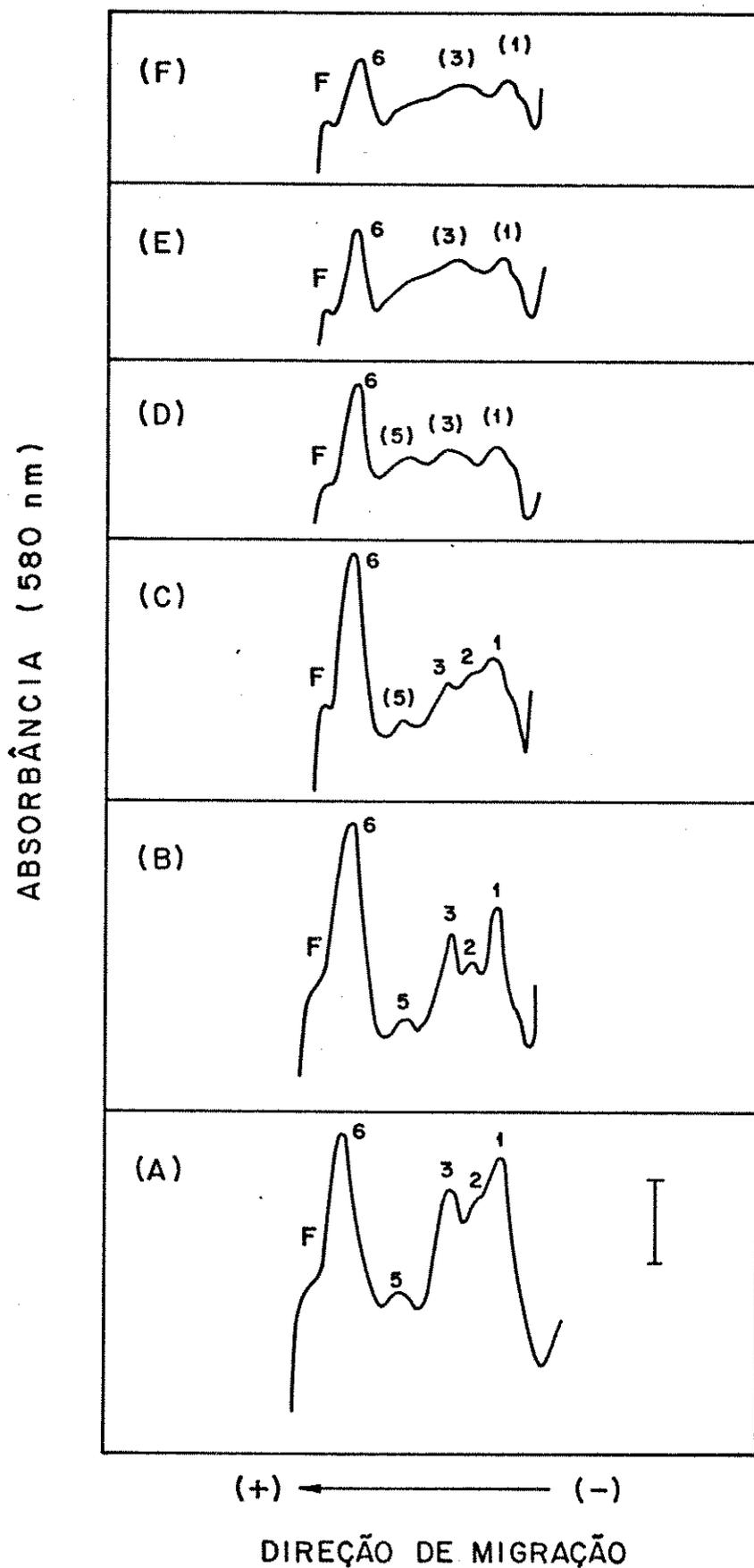


TABELA II - Atividade ribonucleásica em fatias de géis pré-incubados com tampão citrato 0,05 M, pH 5,2, por 30 min a 40°C em ausência e presença de SDS 0,5 mg/ml. O ensaio foi realizado com 1 fatia do gel de 1 mm de espessura, próximo ao centro da banda principal. Os valores representam médias de 2 experimentos.

Concentração de SDS no extrato (mg/ml)	Atividade ribonucleásica residual (%)
0,0	100,0
0,5	21,8

das evidenciadas nos géis são devidas às presenças de isoenzimas de RNase. Contudo, a banda que aparece junto com a frente contendo o azul de bromofenol (banda F), não foi afetada pelo tratamento dos géis com o SDS (Figuras 18 e 19). Portanto, esta banda é "falsa" e seu aparecimento deveu-se, provavelmente, ao fato do RNA não ter penetrado no gel nesta região. Em um outro experimento (resultados não apresentados), quando o SDS foi usado na concentração de 2,0 mg/ml, todas as bandas desapareceram menos a banda F, de intensidade indiscutivelmente menor do que aquela da banda principal. Este resultado confirmou que esta banda de R_f aproximadamente igual a 1 não é uma isoenzima de RNase.

O experimento com SDS também foi realizado com extratos de cotilédones com um dia de germinação, onde a banda 4 é visível, notando-se também o desaparecimento desta banda, (resultados não apresentados). Este resultado sugere, portanto, ser a banda 4 também uma isoenzima de RNase.

4. Efeito da cicloeximida sobre a atividade ribonucleásica durante a germinação.

Os resultados apresentados sobre o comportamento da atividade ribonucleásica nos cotilédones do tratamento controle (Figuras 5 e 8), sugerem que a RNase é uma enzima que ou sofre síntese *de novo*, ou é ativada durante a germinação. Além disso, pode-se pensar na hipótese de que o grande aumento em atividade ribonucleásica provocado pelo estresse salino após o 5º dia de germinação seja consequência, também, da síntese

de novo da molécula enzimática. Como primeiro passo para testar as hipóteses levantadas investigou-se a dependência entre a atividade ribonucleásica e o processo de síntese proteica, o que foi feito com o emprego da cicloeximida, um comprovado inibidor da biossíntese de proteína.

A cicloeximida, ao inibir a síntese proteica, causa uma profunda alteração no metabolismo celular e, como consequência, o crescimento das plantas sofre uma redução (HORIKOSHI & MORITA, 1981; BELOVA et al., 1978). Portanto, para que o efeito observado sobre a RNase não fosse interpretado como sendo uma simples consequência da alteração no metabolismo, alguns experimentos foram realizados no sentido de detectar-se o efeito, porém tornando mínimas as alterações no crescimento das plântulas.

Experimentos preliminares mostraram que as plântulas de feijão com um dia de germinação em água destilada, ao serem deixadas por uma hora em placa de petri contendo papel de filtro umedecido com solução de cicloeximida, e em seguida retornadas ao meio normal de germinação, apresentavam-se no 7º dia com o crescimento fortemente reduzido, mesmo à concentrações muito diluídas do inibidor (resultados não apresentados). Na tentativa de minimizar os efeitos da cicloeximida sobre o crescimento das plântulas, os quais poderiam dificultar a interpretação dos resultados, resolveu-se restringir o tratamento das plântulas com o inibidor somente aos cotilédones. Decidiu-se, portanto, por um simples pincelamento dos cotilédones com a solução de cicloeximida.

Notou-se, no entanto, a necessidade de remoção dos tegumentos para evitar o tempo muito prolongado para que a re

ferida solução penetrasse no cotilédone. Entretanto, observou-se para o caso específico das sementes quiescentes, que a simples remoção dos tegumentos e pincelamento dos cotilédones com água destilada era o suficiente para que a atividade ribonucleásica, medida nos cotilédones após um dia de germinação dessas sementes, se apresentasse com um valor cerca de 7 vezes maior do que o do controle (resultados não apresentados). Torna-se necessário ressaltar que a retirada dos tegumentos das sementes quiescentes, apesar dos cuidados empregados, causou danos físicos nos cotilédones. É possível, por conseguinte, que a injúria mecânica causada nos cotilédones tenha sido a responsável pelo aumento observado em atividade enzimática. A injúria mecânica, segundo TVORUS (1976), é um fator apontado por vários autores como o causador do aumento de atividade de várias enzimas, dentre elas a RNase. No caso específico da RNase, este aumento de atividade é inibido por actinomicina D (SACHER *et al.*, 1975) ou por outros inibidores de síntese protéica ou de ácidos nucleicos (BAGI & FARKAS, 1967), citado por TVORUS (1976).

Observou-se, por outro lado, que a retirada dos tegumentos dos cotilédones de plântulas com um dia após a semeadura, e seu pincelamento com água destilada, não provocou grandes alterações na atividade ribonucleásica nos cotilédones, quando estas eram deixadas germinar por mais alguns dias. Os tegumentos envolvendo os cotilédones de plântulas com um ou mais dias de germinação podem ser removidos sem causar grandes danos físicos ao cotilédone. Tendo em vista esse resultado procedeu-se ao pincelamento dos cotilédones com concentrações crescentes de cicloeximida, em plântulas com um dia de germi

nação, e posterior determinação da atividade ribonucleásica nos cotilédones no 3º dia de germinação. Resultados não apresentados mostraram que a cicloeximida foi um efetivo inibidor do surgimento da atividade ribonucleásica com a germinação. No entanto, como inconveniente, observou-se que nas concentrações mais elevadas do inibidor, onde a atividade da RNase era mais fortemente afetada, o mesmo também acontecia com o crescimento das plântulas.

Com a finalidade de diminuir ainda mais as alterações no crescimento das plântulas, reduziu-se para um dia o tempo de germinação após a aplicação do inibidor nos cotilédones. Portanto, para os experimentos definitivos, a solução de cicloeximida foi aplicada nos cotilédones das plântulas à diversos estágios de germinação, tendo sido a atividade ribonucleásica medida nos cotilédones após um dia de germinação. Experimentos preliminares indicaram que a concentração de 20 µg/ml para a solução de cicloeximida foi a que melhor resultado apresentou para este tipo de experimento, ou seja, inibiu a enzima sem causar grandes alterações no crescimento das plântulas. Todavia, como precaução para compensar as eventuais alterações em atividade ribonucleásica, causadas pela remoção dos tegumentos dos cotilédones e/ou pelo próprio manuseio com as plântulas, o experimento foi seguido, além do controle normal, por um grupo de plântulas onde no lugar de cicloeximida os cotilédones foram pincelados com água destilada. Em virtude da impossibilidade de retirada dos tegumentos das sementes quiescentes sem provocar grandes alterações na atividade da RNase, o efeito da cicloeximida sobre a enzima entre os dias 0 e 1, foi observado deixando-se essas sementes germinarem por

todo o tempo em presença do inibidor.

4.1. Experimento com plântulas semeadas em água destilada.

O efeito da cicloeximida sobre a atividade ribonucleásica foi observado nos cotilédones de plântulas com 1 a 5 dias após a semeadura em água destilada. Como pode ser observado na Tabela III, os valores de atividade total nos cotilédones provenientes do tratamento com cicloeximida (20 µg/ml) foram até o 3º dia, estatisticamente inferiores aos do tratamento com água destilada.

Nos dias 4 e 5 após a semeadura, apesar da análise estatística não ter mostrado diferenças significativas entre os dois tratamentos, há uma tendência dos valores de atividade total serem menores para aqueles do tratamento com o inibidor (Tabela III). Por outro lado, todos os valores de atividade ribonucleásica específica do tratamento com cicloeximida se apresentaram estatisticamente inferiores aos do tratamento com água destilada, confirmando a ação inibitória da cicloeximida sobre a RNase (Tabela III). Os valores de atividades ribonucleásicas total e específica nos cotilédones do tratamento com água destilada só diferiram estatisticamente daqueles do controle, apenas no 2º dia de germinação, se apresentando com valores maiores nos cotilédones tratados com água destilada (Tabela III).

Para melhor destacar o efeito da cicloeximida sobre a RNase foram determinadas as variações diárias em atividades, fato que se justificou tendo-se em vista que o tempo de ação do inibidor nos cotilédones foi de um dia. Tais variações fo

TABELA III - Atividade ribonucleásica de extratos de cotilêdones do controle, tratados com água destilada (A) e com solução de cicloeximida 20 $\mu\text{g/ml}$ (C), provenientes de sementes de feijão de corda pitiúba semeadas em água destilada.

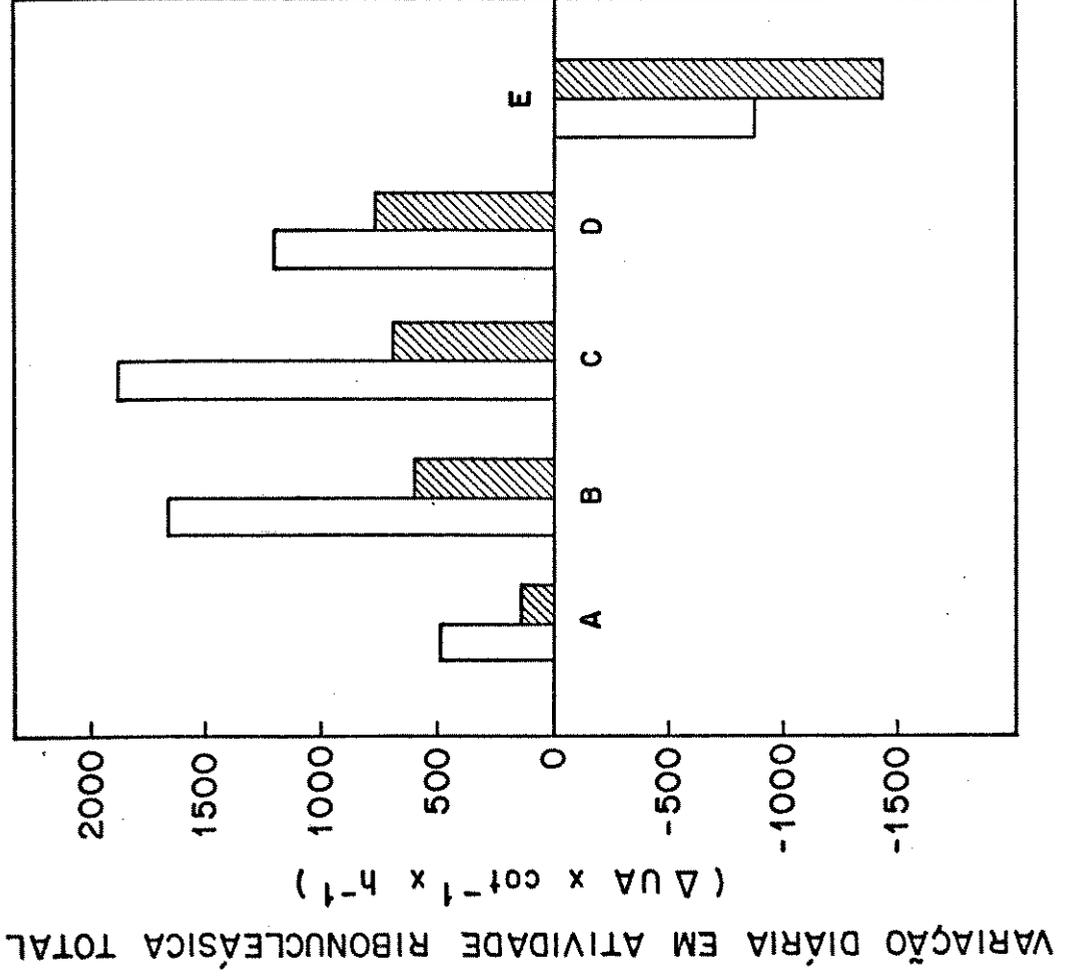
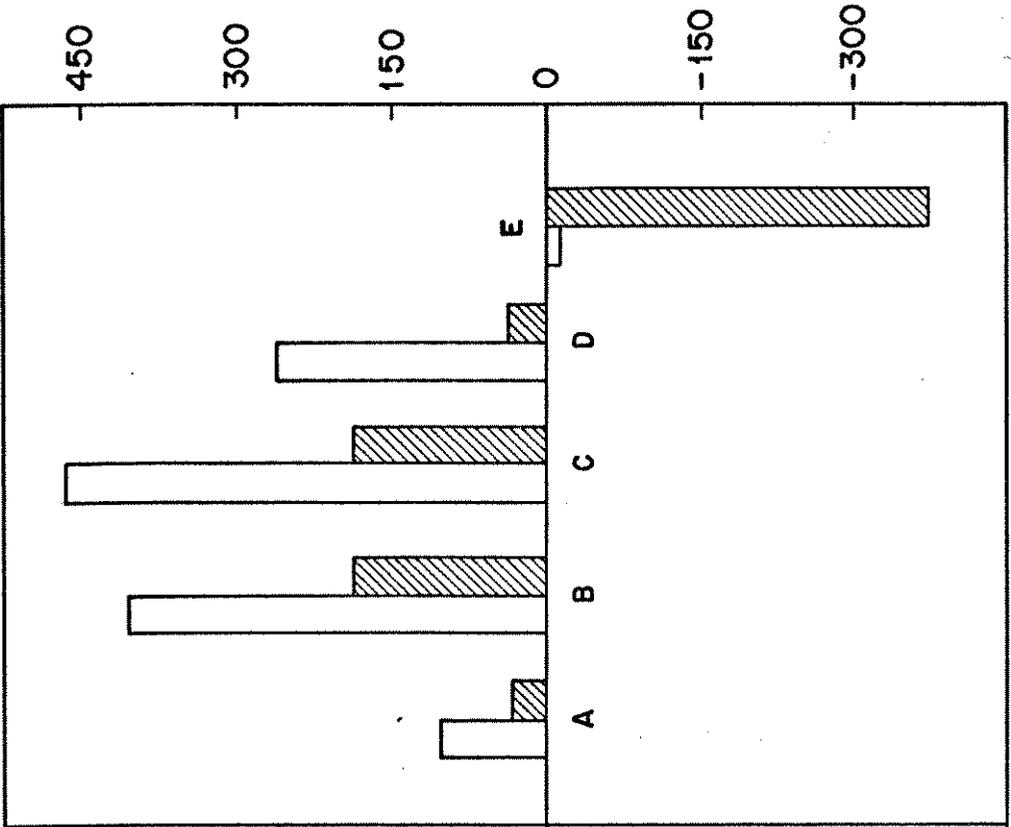
Dias após a semeadura	Atividade total (UA x cot ⁻¹ x h ⁻¹)			Atividade específica (UA x mg Prot ⁻¹ x h ⁻¹)		
	(Controle)	(A)	(C)	(Controle)	(A)	(C)
1	564a	564a	244b	113a	113a	53b
2	1557b	2245a	1150c	315b	520a	300b
3	3355a	3461a	2252b	794a	777a	501b
4	4532a	4558a	4105a	1185a	1053a	833b
5	3804a	3668a	3096a	1193a	1175a	809b

- Os valores de atividades ribonucleásicas total e específica em extratos de cotilêdones de sementes quiescentes foram 112 e 18 respectivamente;
- Os valores de médias na mesma linha, seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

ram estimadas subtraindo-se dos valores de atividades nos co
tilédones tratados com água destilada e com solução de ciclo
eximida, o valor da atividade do controle no dia anterior, sen
do usados para isso os valores apresentados na Tabela III. Co
mo pode ser notado na Figura 20, as variações diárias em ati
vidade ribonucleásica total e específica, tanto para os extra
tos de cotilédones do tratamento com água destilada, como pa
ra aqueles do tratamento com cicloeximida, se apresentaram com
valores positivos (aumentos em atividade enzimática) entre os
dias 0 e 1, 1 e 2, 2 e 3 e 3 e 4 após a sementeira. Porém, os
incrementos observados em atividade enzimática nos cotilédones
tratados com o inibidor de síntese protéica foram indubitavelme
nte menores do que aqueles oriundos do tratamento dos coti
lédones com água destilada. Do 4º para o 5º dia de germinação,
apesar das variações em atividades ribonucleásicas total
e específica se apresentarem negativas (decrêscimos em ativi
dade enzimática) para ambos os tratamentos, a menor variação
foi observada para o tratamento com cicloeximida (Figura 20).
Portanto, o tratamento com cicloeximida causou um maior de
crêscimo em atividade, sugerindo dessa forma, que a RNase a
presenta "turnover", ou seja, sofre síntese e degradação, pois
o bloqueio na síntese da enzima pelo inibidor fez com que ma
ior fosse o decréscimo em atividade da RNase. Concordando com
a idéia de que a RNase apresenta "turnover", observou-se, em
outro experimento, que a atividade ribonucleásica em cotilédo
nes de plântulas com 5 dias de germinação, mostrou valor apro
ximadamente igual à metade daquele observado no 3º dia, como
consequência do pincelamento dos cotilédones com cicloeximida
50 µg/ml nos dias 3 e 4 de germinação (resultados não apresen
tados). Reforçando a idéia do "turnover", SACHER et al. (1975)

FIGURA 20 - Variações diárias em atividades ribonucleásicas de extratos de cotilédones tratados com água destilada () e com solução de cicloheximida 20 µg/ml (), provenientes de sementes de feijão de corda semeadas em água destilada. As variações em atividade foram determinadas entre os dias 0 e 1 (A), 1 e 2 (B), 2 e 3 (C), 3 e 4 (D) e 4 e 5 (E).

VARIACÃO DIÁRIA EM ATIVIDADE RIBONUCLEÁSICA ESPECÍFICA
 ($\Delta UA \times mg \text{ Prot}^{-1} \times h^{-1}$)



VARIACÃO DIÁRIA EM ATIVIDADE RIBONUCLEÁSICA TOTAL
 ($\Delta UA \times cot^{-1} \times h^{-1}$)

demonstraram a existência desse processo para a RNase induzida pela injúria mecânica dos tecidos de nabo.

O fato das medidas de crescimento das plântulas cujos cotilédones foram pincelados com água e com cicloeximida, praticamente não terem se apresentado diferentes (Tabela IV), diminui a possibilidade do efeito inibitório sobre a RNase ter ocorrido como consequência de efeitos secundários no metabolismo, causados pela inibição do processo de síntese protéica. Consequentemente, os resultados apresentados na Tabela III e Figura 20 sugerem que o aumento em atividade ribonucleásica com a germinação é dependente, pelo menos em grande parte do processo de síntese de proteína. Estes resultados foram concordantes com aqueles observados por alguns autores que verificaram ser o aumento da atividade ribonucleásica nos cotilédones durante a germinação total ou parcialmente dependente da síntese *de novo* da enzima (BENNETT & CHRISPPEELS, 1972; BRYANT *et al.*, 1976a, 1976b). Os resultados, no entanto, foram discordantes daqueles encontrados por BARKER *et al.* (1974), que observaram ser o aumento da atividade ribonucleásica com a germinação totalmente independente do processo de síntese protéica.

4.2. Experimento com plântulas semeadas em solução de NaCl 0,1 M.

Neste experimento o efeito da cicloeximida sobre a atividade da RNase nos cotilédones foi observado entre os dias 3 e 7 após a semeadura em solução de NaCl 0,1 M, período onde

TABELA IV - Medidas de comprimento e de peso fresco das plântulas do experimento com cicloeximida (Tabelas III e V e Figuras 20 e 21). (A) e (C) representam plântulas cujos cotilédones foram pincelados com água destilada e com solução de cicloeximida 20 µg/ml, respectivamente.

Dias após a semeadura	Germinação em água destilada				Germinação em NaCl 0,1 M							
	Comprimento (cm)		Peso fresco (mg x plântula ⁻¹)		Comprimento (cm)		Peso fresco (mg x plântula ⁻¹)					
	(A)	(C)	(A)	(C)	(A)	(C)	(A)	(C)				
2	3,7	3,3	2,9	84	73	63		
3	11,4	10,7	10,4	369	345	290	3,6	...	66	...		
4	23,6	21,5	21,6	886	764	729	6,4	5,5	5,6	117	113	112
5	35,8	30,8	29,9	1343	1092	1001	11,2	8,7	8,0	331	185	182
6	14,4	13,5	13,8	503	422	372
7	18,7	16,6	19,9	701	641	665

- (...) situações onde não foram feitas observações.

foi alta a taxa de crescimento da atividade enzimática, chegando a atingir valores de atividade muito superiores aos encontrados para as plântulas germinadas em água destilada (Figuras 5 e 8). Como no experimento anterior, o efeito da cicloeximida foi observado um dia após a sua aplicação nos cotilédones, e a vários estágios de germinação. Os resultados apresentados na Tabela V mostram que os valores de atividades ribonucleásicas total e específica nos cotilédones tratados com o inibidor foram estatisticamente inferiores àqueles de cotilédones tratados com água destilada. Em alguns casos os valores de atividade da RNase nos cotilédones tratados com água destilada se mostraram estatisticamente superiores aos do controle (Tabela V), demonstrando que a retirada dos tegumentos e/ou o próprio manuseio com as plântulas provocaram aumentos na atividade da RNase. As variações diárias em atividades ribonucleásicas total e específica nos cotilédones pincelados com água destilada se apresentaram, em todos os períodos observados, com valores positivos e sempre superiores àqueles dos cotilédones tratados com cicloeximida 20 µg/ml (Figura 21). Este resultado demonstrou a existência de uma estreita correlação entre o aumento observado em atividade ribonucleásica entre o 3º e 7º dias de germinação em condições salinas (Figuras 5 e 8) e o processo de síntese protéica. Da mesma forma que no experimento anterior, o crescimento das plântulas cujos cotilédones foram pincelados com cicloeximida, praticamente não diferiu do crescimento daquelas com cotilédones pincelados com água destilada (Tabela IV).

Como pode ser notado na Tabela V, no 7º dia de germinação após a sementeira, tanto a atividade ribonucleásica total como a específica nos cotilédones tratados com cicloeximi

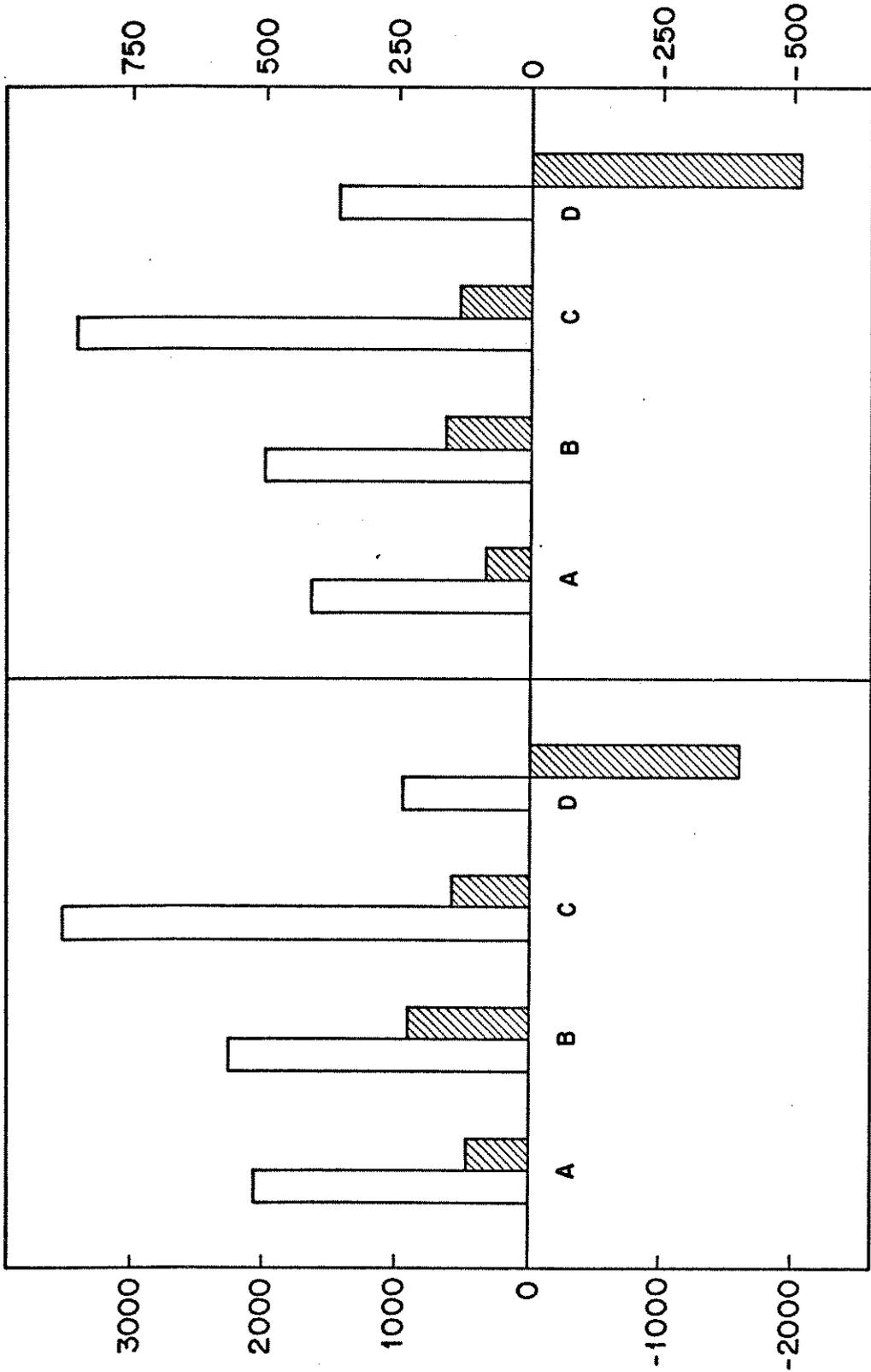
TABELA V - Atividade ribonucleásica de extratos de cotilédones do controle, tratados com água destilada (A) e com solução de cicloeximida 20 $\mu\text{g/ml}$ (C), provenientes de sementes de feijão de corda piúba semeadas em solução de NaCl 0,1 M.

Dias após a semeadura	Atividade total (UA x cot^{-1} x h^{-1})			Atividade específica (UA x mg Prot^{-1} x h^{-1})		
	(Controle)	(A)	(C)	(Controle)	(A)	(C)
4	2239b	3251a	1910b	544b	732a	409b
5	3950a	4477a	3131b	1005a	1045a	702b
6	7977a	7468a	4530b	2111a	1850a	1144b
7	6914b	8912a	6369b	2088a	2476a	1605b

- Os valores de atividades ribonucleásicas total e específica do controle no 3º dia de germinação foram 1460 e 324 respectivamente;
- Os valores de médias na mesma linha seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURA 21 - Variações diárias em atividades ribonucleásicas de extratos de cotilédones tratados com água destilada () e com solução de cicloheximida 20 µg/ml (), provenientes de sementes de feijão de corda semeadas em solução de NaCl 0,1 M. As variações em atividades foram determinadas entre os dias 3 e 4 (A), 4 e 5 (B), 5 e 6 (C) e 6 e 7 (D).

VARIACÃO DIÁRIA EM ATIVIDADE RIBONUCLEÁSICA ESPECÍFICA ($\Delta UA \times mg \text{ Prot}^{-1} \times h^{-1}$)



VARIACÃO DIÁRIA EM ATIVIDADE RIBONUCLEÁSICA TOTAL ($\Delta UA \times cot^{-1} \times h^{-1}$)

da 20 $\mu\text{g/ml}$ se apresentaram com valores inferiores aos dos respectivos controles no 6º dia de germinação. Como consequência disso, as variações em atividades ribonucleásicas total e específica se apresentaram com valores negativos do 6º para o 7º dia de germinação (Figura 21). Por outro lado, como neste mesmo período essas variações em atividades nos cotilédones tratados com água destilada se apresentaram com valores positivos (Figura 21), deduz-se que o tratamento com o inibidor além de ter evitado que a atividade aumentasse, causou uma redução no nível da enzima preexistente no dia da aplicação do tratamento. Este resultado mais uma vez confirma a idéia de que a RNase é uma enzima que apresenta "turnover" com a germinação.

Como os valores de atividade enzimática do controle na Tabela III se apresentaram crescentes até o 4º dia de germinação, é lógico admitir-se que até este dia o processo de síntese da enzima supere àquele de sua degradação. Entretanto, em condições salinas os valores de atividade no controle (Tabela V) se apresentaram crescentes até o 6º dia de germinação, sugerindo que até este dia o processo de síntese da enzima supere aquele de sua degradação. Pelo menos duas hipóteses são possíveis para explicar o mais alto nível da enzima em condições salinas a partir do 7º dia de germinação (Figuras 5 e 8): uma seria de que em condições salinas o processo de síntese da enzima ocorreria numa velocidade maior do que aquela do controle, supondo serem iguais em ambos os tratamentos as velocidades de degradação da enzima; a outra hipótese seria de que em condições salinas o processo de degradação da enzima ocorreria numa velocidade menor do que a do controle, su

pondo, neste caso, iguais velocidades de síntese da enzima em ambos os tratamentos. Os resultados apresentados não são suficientes para um completo esclarecimento da questão. No entanto, como o resultado apresentado na Figura 21 mostrou que do 6º para o 7º dia de germinação em condições salinas, houve uma acentuada queda na atividade da RNase nos cotilédones tratados com cicloeximida, ao contrário do que ocorreu com a atividade nos cotilédones tratados com água destilada (que se mostrou crescente), supõe-se que o processo de degradação da enzima tenha ocorrido de forma eficiente. Ademais, caso o processo de destruição da enzima sob condições salinas fosse menor do que aquele em condições controle, provavelmente as variações negativas em atividade da RNase deveriam ser menores do que aquelas observadas, em condições controle (Figuras 20 e 21), fato que não aconteceu. É possível, portanto, que o mais alto nível da RNase nos dias 7 e 9 após a semeadura nos cotilédones do tratamento salino (Figuras 5 e 8) seja consequência de um estímulo na síntese da enzima e não à uma inibição do sistema enzimático responsável pela destruição da RNase. Concordando com este ponto de vista, SACHER et al. (1975) observaram que o nível da RNase induzida pela injúria mecânica dos tecidos de nabo é regulado pelo processo de síntese da enzima e não pelo de degradação.

4.3. Efeito da cicloeximida sobre as isoenzimas de RNase de cotilédones de plântulas semeadas em água destilada.

Para melhor destacar o efeito da cicloeximida nos co

tilédones de plântulas semeadas em água destilada, experimentos preliminares foram desenvolvidos no sentido de ampliar o efeito do inibidor sobre a atividade ribonucleásica, sem que o crescimento fosse demasiadamente alterado. Um desses experimentos apresentou resultado satisfatório e constou da embebição das sementes quiescentes, à vários tempos em água destilada e em solução de cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$, quando em seguida essas sementes foram semeadas em condições normais de germinação. Posteriormente, com um dia de germinação, os cotilédones de plântulas intactas foram pincelados com água destilada e com solução de cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$, sendo as plântulas deixadas germinar por mais 2 dias, quando então os cotilédones foram coletados. Determinações de atividade ribonucleásica nos extratos desse cotilédones revelaram que, quanto maior o tempo de embebição das sementes quiescentes em água destilada, maior a atividade enzimática (Tabela VI). Poderia-se pensar que esse aumento em atividade enzimática fosse devido a um aumento na velocidade de germinação provocado pelos maiores tempos de embebição. Desta forma, seria então possível que as plântulas oriundas de sementes quiescentes, que foram embebidas por 5 horas em água, estivessem num estágio de germinação mais avançado do que aquelas que foram embebidas por 3 horas, as quais, por sua vez, se encontrariam num estágio mais avançado do que as que foram embebidas por apenas uma hora. Portanto, isto faria com que a atividade ribonucleásica nos cotilédones se apresentasse com comportamento crescente com o tempo de embebição, da mesma forma que o apresentado por ela nos primeiros dias de germinação (Tabela III). Todavia, este não parece ter sido o caso, pois não foram constatadas diferenças significativas nos crescimentos das plântulas em função do tempo de

TABELA VI - Atividade ribonucleásica de extratos de cotilédones de plântulas de feijão de corda pitiúba com 3 dias de germinação em função do tempo de embebição das sementes quiescentes em água destilada (A) e em solução de cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$ (C). No 1º dia de germinação os cotilédones de plântulas intactas do tratamento (A) foram pinçelados com água destilada e os do tratamento (C) com solução de cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$. Os valores representam médias de 3 ensaios.

Tempo de embebição (horas)	Atividade total (UA x cot ⁻¹ x h ⁻¹)		Atividade específica (UA x mg Prot ⁻¹ x h ⁻¹)	
	(A)	(C)	(A)	(C)
1	2930	2943	520	624
3	4290	3434	863	765
5	5062	2063	1055	446

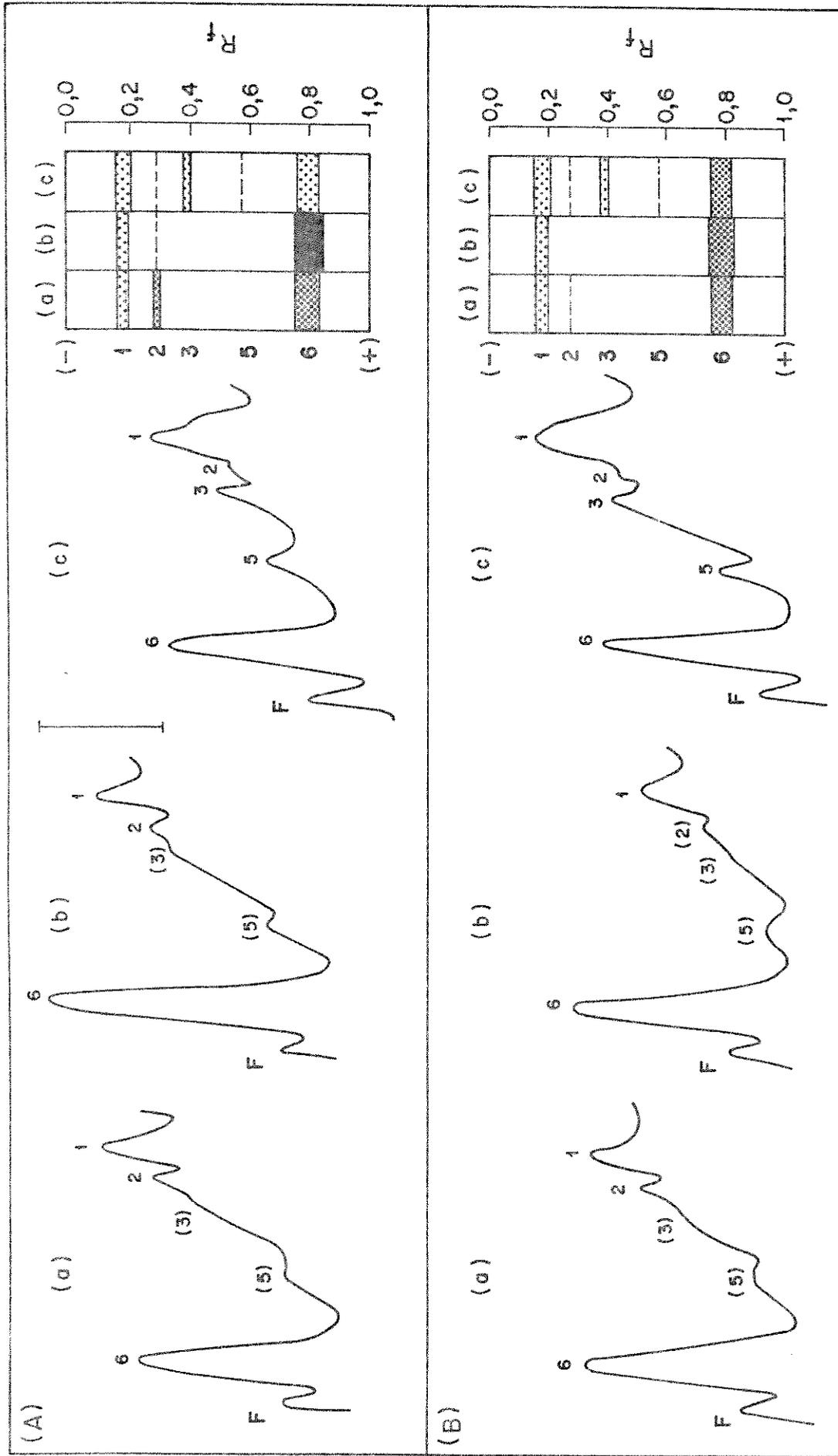
embebição das sementes em água destilada (resultados não apresentados). É possível que o aumento em atividade ribonucleásica seja devido ao estresse gasoso imposto às sementes durante o período de embebição (condições de baixa concentração de oxigênio).

Dos tempos de embebição em cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$ testados, o que apresentou mais alto nível de inibição (cerca de 60%) em atividade RNásica foi o de 5 horas (Tabela VI). O tratamento com cicloeximida no qual as sementes foram embebidas por uma hora, não foi suficiente para causar inibição na atividade da RNase, enquanto que o de 3 horas causou uma inibição de apenas 20% (Tabela VI). De acordo com este resultado, optou-se por fazer-se eletroforese para determinação das isoenzimas de RNase nos extratos de cotilédones de plântulas dos tratamentos com 1 e 5 horas de embebição em água destilada, e com 5 horas de embebição em solução de cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$.

Quando foram aplicadas nos géis as mesmas quantidades de proteína, a banda principal apresentou-se com menor e maior intensidade nos extratos de cotilédones provenientes de plântulas, cujas sementes quiescentes foram embebidas por 5 horas em solução de cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$ e por 5 horas em água destilada, respectivamente (Figura 22 A). Portanto, as bandas principais nos diversos tratamentos apresentaram-se com intensidades concordantes com os valores de atividade ribonucleásica mostrados na Tabela VI. Este fato reforça a idéia anteriormente exposta de que a atividade da banda principal representa uma parcela preponderante de toda a atividade ribonucleásica do extrato.

Nos géis contendo os extratos de cotilédones de plân

FIGURA 22 - Isoenzimas de RNase de extratos de cotilédones de plântulas com 3 dias de germinação em água destilada, provenientes de sementes quiescentes de feijão de corda pitiúba embebidas por 1 hora em água destilada (a), por 5 horas em água destilada (b) e por 5 horas em solução de cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$ (c). Com 1 dia de germinação os cotilédones dos tratamentos (a) e (b) foram pincelados com água destilada e os do tratamento (c) com cicloeximida 5 $\mu\text{g/ml}$. Em (A) foram aplicadas quantidades equivalentes de proteína, sendo os números de UA aplicados em (a), (b) e (c), respectivamente iguais a 144, 239 e 94; em (B) foram aplicadas em cada gel 120 UA. Os números sobre os picos (zonas de menores absorbâncias) representam as bandas de isoenzimas de RNase, sendo que aqueles entre parênteses indicam as que não foram visíveis nos géis por ocasião de seus desenhos. A barra vertical desenhada em (A), corresponde a uma A_{580} de 0,100, sendo esta escala a mesma para os demais gráficos. As leituras de absorbância foram feitas entre 19 e 20 horas após os géis terem sido deixados em água destilada.



ABSORVÂNCIA (580 nm)

INTENSIDADE

(+) ← (-) (-) → (+) (-) → (+) (-) → (+)

DIREÇÃO DE MIGRAÇÃO

tulas originárias de sementes quiescentes embebidas por 1 e 5 horas em água destilada, foram visíveis as bandas secundárias 1 e 2, enquanto que naquele referente ao tratamento com cicloeximida foram visíveis as bandas secundárias 1, 2, 3 e 5 (Figura 22 A). Como pode ser observado mais facilmente nos gráficos de A_{580} dos géis, a principal diferença entre os tratamentos das sementes por 1 e 5 horas em água destilada foi quanto à intensidade da banda principal, que se apresentou com pico muito maior para o tratamento com maior tempo de embebição (Figura 22 A). Por conseguinte, o grande aumento em atividade ribonucleásica provocado pela embebição das sementes quiescentes por 5 horas em água destilada, não se deveu à formação de novas isoenzimas e sim a um forte aumento na intensidade da banda principal (Tabela VI e Figura 22 A).

As bandas secundárias no gel com extrato de cotilédones referente ao tratamento com cicloeximida se apresentaram, com exceção da banda 2, com intensidades um pouco maiores do que as dos géis referentes aos outros tratamentos (Figura 22 A). Isto pode ter ocorrido como consequência da inibição do crescimento das plântulas pelo tratamento com cicloeximida, fazendo com que estas bandas diminuíssem de intensidades com a germinação de uma forma mais demorada do que a normalmente observada (Figuras 10 e 12). As plântulas do tratamento com cicloeximida apresentaram-se com o comprimento total cerca de 42% menor do que aquele das plântulas do tratamento com água (resultados não apresentados). Este efeito da cicloeximida sobre as bandas secundárias foi semelhante, àquele do NaCl (que também reduz o crescimento das plântulas), onde as bandas secundárias se apresentaram, de um modo geral, com intensidades

maiores do que as do controle (Figuras 10, 11 e 12).

Quando os mesmos números de UA foram aplicados nos géis a banda principal referente ao tratamento com cicloeximida apresentou-se com intensidade ligeiramente inferior a dos outros tratamentos (Figura 22 B). Em contraste, as bandas secundárias nesse tratamento se apresentaram, de um modo geral, superiores às daquelas dos outros tratamentos, em função das diluições que os extratos desses tratamentos sofreram para ficarem com as mesmas UA/ml do que aquele do tratamento com cicloeximida. Estes resultados sugeriram que o principal efeito da cicloeximida foi causar uma forte redução na banda principal. Extrapolando esses resultados para aqueles observados na Tabela III e Figura 20, pode-se admitir que a inibição observada na atividade ribonucleásica pela cicloeximida, tenha sido devido à uma inibição na atividade da banda principal. Como consequência pode-se afirmar que o grande aumento de intensidade observado nas Figuras 10 e 12, para a banda principal é dependente do processo de síntese proteica.

4.4. Efeito da cicloeximida sobre as isoenzimas de RNase de cotilédones de plântulas semeadas em solução de NaCl 0,1 M.

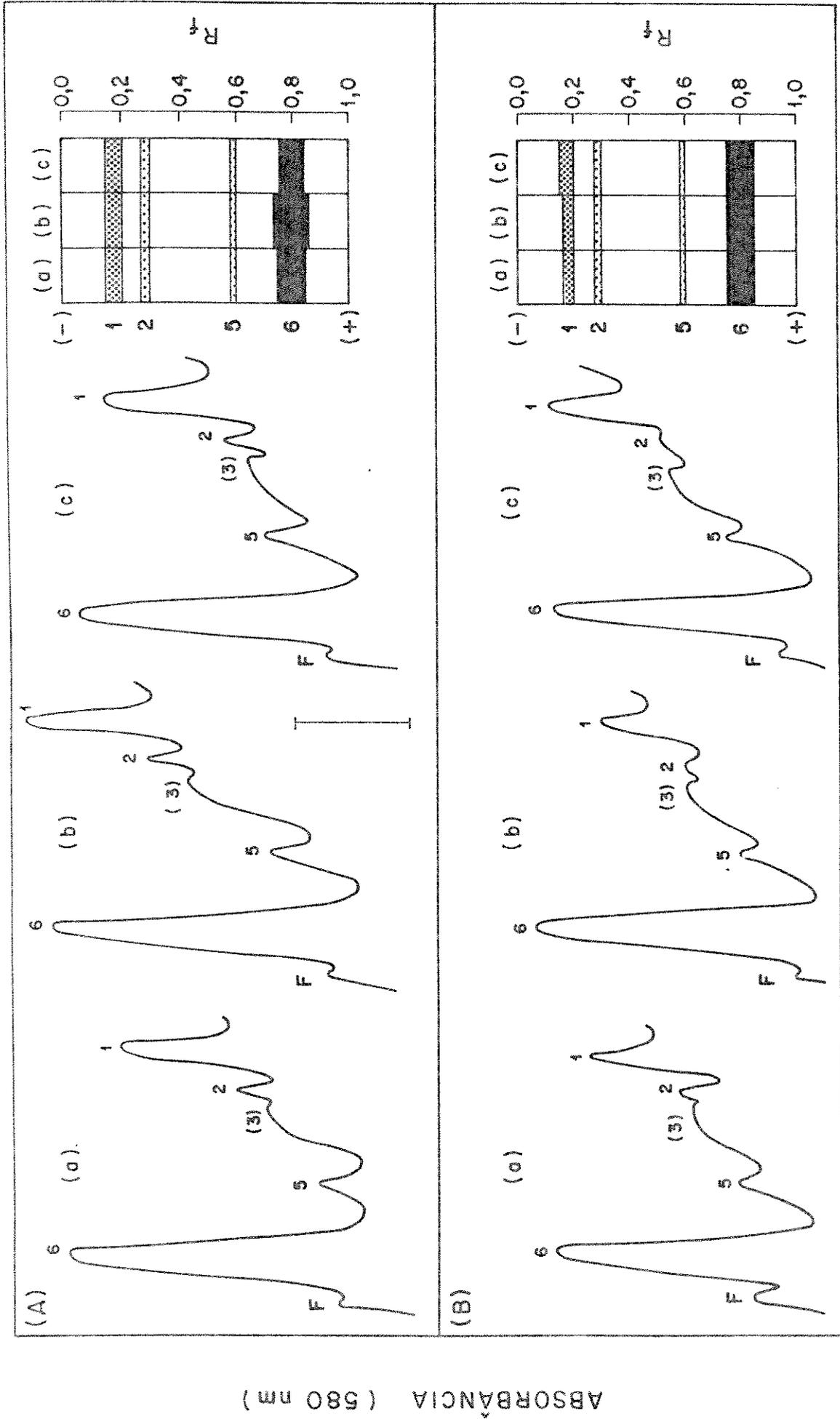
O efeito da cicloeximida sobre as isoenzimas de RNase foi observado em cotilédones do controle, tratados com água destilada e com solução de cicloeximida 20 µg/ml, provenientes de plântulas de feijão com 6 dias de germinação em NaCl 0,1 M. O tratamento com água e com o inibidor de síntese proteica constou do pincelamento dos cotilédones de plântulas no 5º dia

de germinação com água destilada e com solução de cicloeximida 20 μ g/ml.

Em géis contendo quantidades equivalentes de proteínas, a banda principal apresentou-se com menor e maior intensidade nos extratos de cotilédones tratados com cicloeximida e com água destilada, respectivamente (Figura 23 A). As bandas secundárias 1, 2 e 5 foram visíveis nos 3 géis e se apresentaram com intensidades praticamente iguais (Figura 23 A). As diferenças nas intensidades das bandas principais dos tratamentos com água e com cicloeximida não se apresentaram maiores, possivelmente porque o tempo de ação do inibidor foi de apenas 1 dia. Contudo foi nítida a inibição na banda principal como consequência do tratamento dos cotilédones com o inibidor de síntese de proteína.

Nos géis contendo os mesmos números de UA, as diferenças entre o controle e os dois tratamentos foram muito pequenas (Figura 23 B). Enquanto as bandas 2, 5 e 6 se apresentaram com praticamente as mesmas intensidades nos 3 géis, a banda 1 se mostrou com intensidade um pouco maior no gel contendo o extrato de cotilédones do tratamento com cicloeximida. Provavelmente isto ocorreu em função da inibição da banda principal no extrato de cotilédones tratados com o inibidor, que por sua vez representa grande parte da atividade total do extrato. Portanto, para que nos géis fossem aplicadas iguais quantidades de UA, aplicou-se naquele do tratamento com cicloeximida um pouco mais das bandas secundárias, em função da inibição da banda principal, o qual foi detectado apenas para o caso da banda secundária de maior intensidade (banda 1). Estes resultados concordam com aquele onde foram

FIGURA 23 - Isoenzimas de RNase de extratos de cotilédones do controle (a), tratados com água destilada (b) e com solução de cicloeximida 20 µg/ml (c), provenientes de plântulas de feijão de corda pitiúba com 6 dias de germinação em solução de NaCl 0,1 M. No 5º dia de germinação os cotilédones do tratamento (b) foram pincelados com água destilada e aqueles do tratamento (c) pincelados com cicloeximida 20 µg/ml. Em (A) foram aplicadas quantidades equivalentes de proteína, sendo os números de UA aplicados em (a), (b) e (c), respectivamente, iguais a 536, 700 e 423 e em (B) foram aplicadas em cada gel 360 UA. Os números sobre os picos (zonas de menores absorbâncias) representam as bandas de isoenzimas de RNase, sendo que aqueles entre parênteses indicam as que não foram visíveis nos géis por ocasião de seus desenhos. A barra vertical desenhada em (a), corresponde a uma A_{580} de 0,100, sendo esta escala a mesma para os demais gráficos. As leituras de absorbância foram feitas entre 19 e 20 horas após os géis terem sido deixados em água destilada.



ABSORVÂNCIA (580 nm)

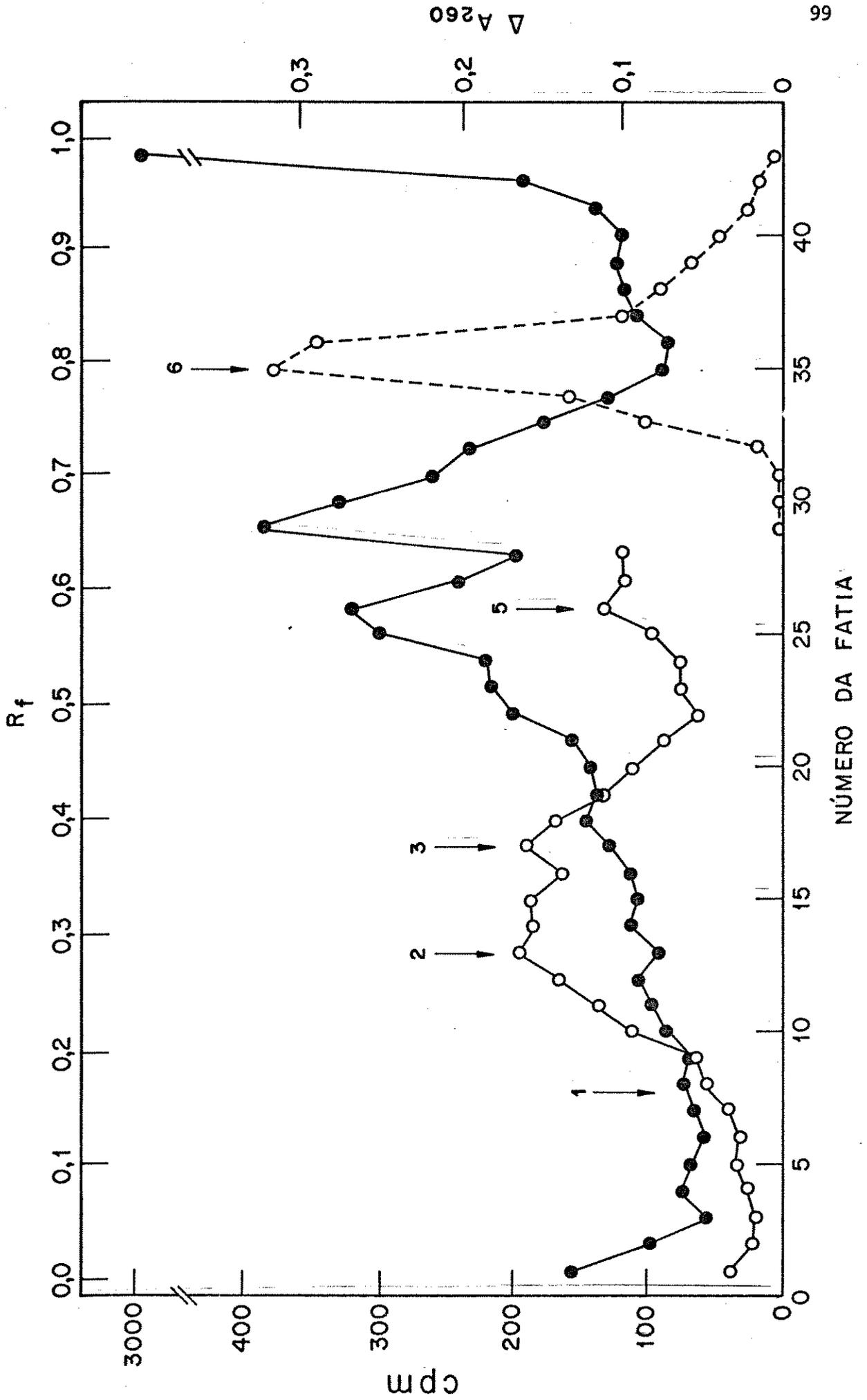
aplicadas quantidades iguais de proteína, e sugerem que o principal efeito da cicloeximida foi causar uma inibição na atividade da banda principal.

Dos resultados apresentados, pode-se deduzir que a inibição na atividade ribonucleásica causada pela cicloeximida (Tabela V e Figura 21), deveu-se à uma redução na intensidade da banda principal, desde que a banda 1, que aumentou um pouco de intensidade com a germinação (Figuras 11 e 12), não foi inibida pelo tratamento com a cicloeximida (Figura 23). Pode-se também admitir que o grande aumento de intensidade da banda principal com a germinação (Figuras 11 e 12) seja dependente do processo de síntese de proteína.

5. Radioatividade e atividade ribonucleásica em fatias dos géis após eletroforese.

Embora os resultados dos experimentos com a cicloeximida sugiram que o aumento na atividade ribonucleásica com a germinação seja dependente do processo de síntese proteica, não se pode afirmar com segurança que a RNase seja sintetizada *de novo*. Na tentativa de elucidar a questão alguns experimentos com radioisótopos foram realizados. Investigou-se a possibilidade de incorporação de leucina-1-C-14 na ribonuclease como consequência do tratamento dos cotilédones de plântulas intactas com o radioisótopo. Os resultados apresentados na Figura 24, realizados com plântulas semeadas em solução de NaCl 0,1 M, revelaram a ausência de picos de radioatividade, que possam sugerir significativa incorporação da marcação nas

FIGURA 24 - Fracionamento do extrato de cotilédones de plântulas com 6 dias após a semeadura em NaCl 0,1 M, através de eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior seccionamento dos géis em fatias de 1 mm de espessura. O tempo de contagem da radioatividade (●—●) nas amostras (fatias de 2 géis) foi de 10 min e a atividade ribonucleásica (ΔA_{260}) determinada com 15 min (O—O) e 12h (O—O) de reação (amostras contendo fatias de 12 géis). As fatias foram numeradas em ordem crescente a partir do topo do gel a 7% em acrilamida. As setas numeradas apontam os locais a proximados das isoenzimas de RNase na curva de atividade enzimática.



regiões do gel onde se localizam as isoenzimas de RNase, exceto para o caso específico da isoenzima correspondente a banda 5. Porêm como esta isoenzima preexiste na semente quiescente e diminui de intensidade com a germinação (Figuras 11 e 12), é improvável que tenha ocorrido uma incorporação de leucina marcada com C-14 em sua cadeia polipeptídica. Observouse um baixo nível de radioatividade justamente na região da banda principal, a isoenzima provavelmente sintetizada *de novo* durante a germinação (Figura 24). Convém ressaltar que o resultado negativo observado não se constitui em prova definitiva de que a RNase não seja sintetizada *de novo*. É possível que o grande aumento na intensidade da banda principal com a germinação (Figuras 11 e 12) envolva apenas a formação de um baixo número de moléculas, resultando num acréscimo de moléculas insuficiente para ser detectado através da técnica empregada. Em adição a isso, pode ocorrer que seja baixo o teor de leucina na cadeia polipeptídica da RNase o que ocasionaria um baixo nível de incorporação da radioatividade na molécula. Os poucos dados existentes na literatura a esse respeito mostram a existência de uma variação na composição de aminoácidos nas RNases, dificultando o esclarecimento da questão. Enquanto que na RNase bovina a leucina representa cerca de 1,6% do número total de resíduos de aminoácidos da molécula (MOORE & STEIN, 1973), em milho (WILSON, 1967) e em centeio (KULIGOWSKA et al., 1980) ela representa cerca de 7,6 e 4,3% do total, respectivamente.

É conveniente mencionar que o resultado negativo observado não foi consequência de um baixo nível de radioatividade aplicada nos cotilédones. Vários outros experimentos fou

ram realizados, não só com plântulas semeadas em solução salina, como também com aquelas semeadas em água destilada nas quais quantidades crescentes do radioisótopo foram aplicadas nos cotilédones. De um modo geral, os resultados obtidos foram semelhantes aos da Figura 24, verificando-se, no entanto, um acréscimo em radioatividade na fatia correspondente à frente contendo o azul de bromofenol, à medida que aumentava-se a radioatividade nos cotilédones (resultados não apresentados). É possível que grande parte da radioatividade que saiu junto com o azul de bromofenol, seja devido à presença de leucina-1-C-14 livre, indicando desta forma, sua disponibilidade para participar do processo de síntese de proteína. Portanto, o experimento da Figura 24, no qual se usou o mais alto dos níveis testados de radioatividade nos cotilédones, foi realizado em condições plenas de disponibilidade de leucina-1-C-14. Prova disto pode ser observada na Figura 24, onde a fatia do gel de maior número, que corresponde à região onde se encontra a frente contendo o azul de bromofenol, apresentou valor de cpm 7,7 vezes maior do que aquele do maior pico de radioatividade, sugerindo desta forma, a presença do radioisótopo na forma livre no extrato.

Em geral foi alta a recuperação da radioatividade nos géis, tomando-se por base apenas a radioatividade incorporada em proteína. Prova disso foi obtida realizando-se experimentos com extratos previamente purificados com sulfato de amônio, quando a recuperação da radioatividade incorporada em proteína, determinada precipitando-se o extrato com TCA 5%, atingiu valor da ordem de 90% (resultados não apresentados).

Convém salientar que alguns experimentos foram rea

lizados nos quais a radioatividade nas fatias dos géis foi de terminada por uma outra técnica desenvolvida por MOSS & INGRAM (1965). Neste caso, as fatias dos géis foram dissolvidas em H_2O_2 30% a $60^\circ C$ por cerca de 8 horas, e as amostras líquidas foram adicionadas ao coquetel de cintilação contendo triton X-100 para contagem da radioatividade. Esta técnica, apesar de mais trabalhosa do que a descrita no Material e Métodos, não apresentou melhores resultados.

Os valores de ΔA_{260} das fatias dos géis representados na Figura 24, permitiram uma melhor avaliação a respeito das atividades das isoenzimas de RNase do que aquela feita a través dos desenhos esquemáticos e gráficos de A_{580} dos géis. Como pode ser observado, o pico correspondente à banda principal foi obtido a partir de valores de ΔA_{260} para tempos de reação de 15 min, enquanto que os outros valores foram para tempos de 12 horas. Deste modo, pode-se deduzir que a banda principal, tem atividade enzimática superior aquela das outras isoenzimas, aproximadamente, da ordem de 50 vezes. Este resultado concorda com as afirmações feitas anteriormente de que a atividade da banda principal representava uma parcela muito grande de toda a atividade do extrato.

Os ensaios de atividade ribonucleásica realizados com as fatias dos géis revelaram a existência de picos de atividade em regiões muito próximas daquelas correspondentes aos valores médios de R_f das bandas secundárias 2, 3 e 5, não sendo, todavia, evidenciada com clareza a existência de pico de atividade correspondente à banda 1 (Figura 24). No máximo, os resultados sugeriram a presença de um ombro próximo a região onde se localiza a banda 1. Este resultado discorda daqueles

apresentados nas Figuras 11 e 12, nos quais esta banda se mostrou, no 7º dia após a semeadura, como sendo, entre as secundárias, a de maior intensidade. É possível, por conseguinte, que o descoramento do gel na região da banda 1, seja em grande parte devido ao "efeito proteína" apontado por JACOBSEN (1980) o qual, por razões desconhecidas, não foi evidenciado nos experimentos com o SDS (Figuras 18 e 19). Em favor desta hipótese está o fato de, no 7º dia após a semeadura, ser muito alta a concentração de proteína na região da banda 1 (Figura 16).

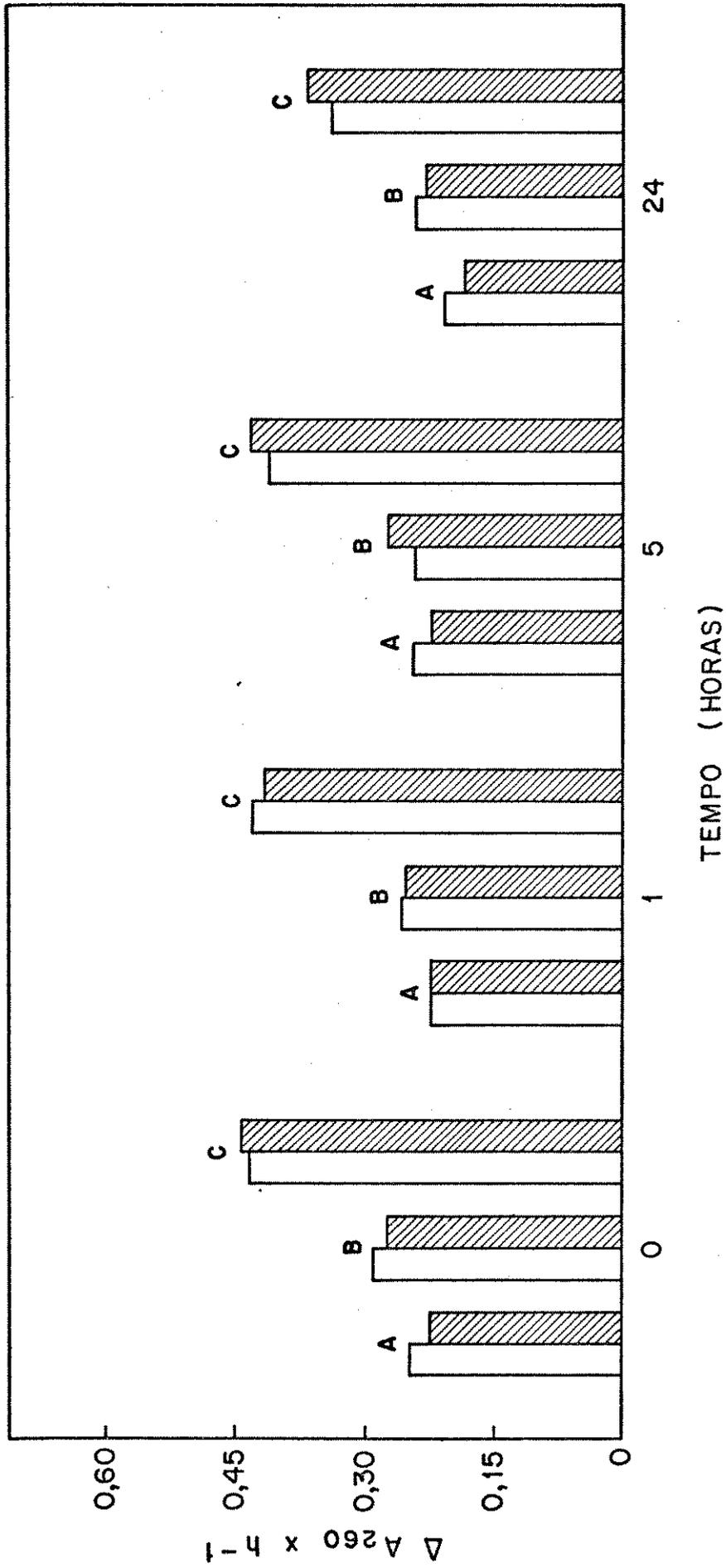
A falta de simetria do pico correspondente à banda 6, sugere a existência de uma outra isoenzima de RNase com R_f próximo a 0,90 (Figura 24). Experimentos semelhantes a este, porém envolvendo o corte de apenas 1 gel, evidenciaram a presença dessa isoenzima (resultados não apresentados). Também usando-se extratos mais concentrados do que aqueles dos experimentos das Figuras 10, 11 e 12, esta isoenzima foi evidenciada no gel corado com azul de toluidina (resultados não apresentados).

6. Investigação sobre as possíveis existências de uma protease ativadora da RNase e de um inibidor da enzima.

Embora os experimentos com o radioisótopo tenham apresentado resultados negativos com relação à incorporação da marcação na RNase, os experimentos com cicloeximida mostraram claramente, uma forte dependência entre o aumento de atividade da enzima com a germinação e o processo de síntese de proteína (Tabelas III e V, Figuras 20 e 21). Por conseguinte,

não se pode descartar a hipótese da existência de uma protease, que seria sintetizada *de novo* durante a germinação, e que ativaria a RNase preexistente na semente quiescente, supostamente numa forma inativa. É evidente que a confirmação desta hipótese explicaria a necessidade do processo de síntese proteica para que a atividade ribonucleásica aumentasse com a germinação, independentemente da síntese *de novo* da molécula enzimática. Existindo tal protease é provável que seu nível nos cotilédones se apresente mais elevado nos dias 3 e 4 após a semeadura, período onde a atividade ribonucleásica no controle se mostra com altos valores (Figuras 5 e 8). Com base nessas considerações fez-se uma tentativa no sentido de testar a hipótese de existência da protease ativadora da RNase. Os extratos de cotilédones com alta atividade (3º e 4º dia) foram misturados com igual volume de um outro extrato de baixa atividade (1º dia), ou misturados entre si, sendo a mistura deixada por vários tempos a 25°C, a fim de que a referida protease pudesse agir sobre a suposta forma inativa da RNase. Neste experimento, o tampão de extração teve seu pH elevado para 7,0, de modo a se extrair uma maior quantidade de proteína. Os resultados apresentados na Figura 25 não revelaram aumentos significativos de atividade ribonucleásica nas misturas dos extratos. Como pode ser notado, os valores de $\Delta A_{260} \times h^{-1}$ para as misturas de extratos foram praticamente iguais à soma desses valores nos extratos individuais para todos os tempos testados. Os resultados apresentados não confirmaram, por conseguinte, a presença da suposta protease ativadora da RNase, pelo menos, nas condições empregadas. Os resultados, por outro lado, demonstraram a grande estabilidade da RNase, que após 24 horas à 25°C, apresentou em média, 83% da atividade obser

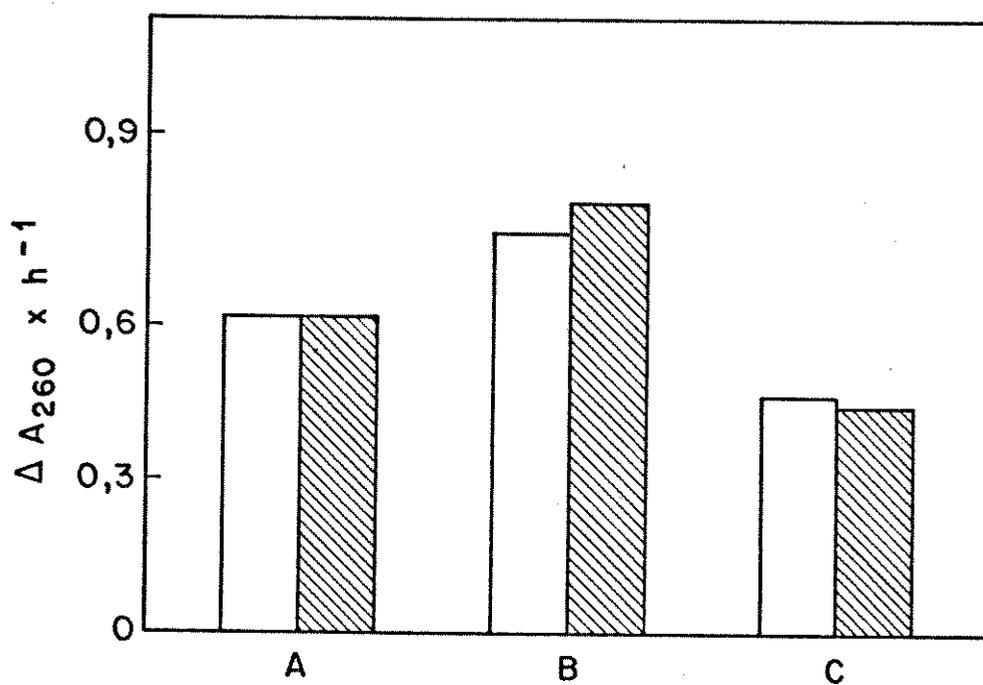
FIGURA 25 - Atividade ribonucleásica da mistura de extratos () e soma dos valores de atividade dos extratos isoladamente (), em função do tempo de incubação a 25°C. Os valores em (A), (B) e (C) são referentes, respectivamente, à associação dos extratos de cotilédones de plântulas com 1 e 3; 1 e 4 e 3 e 4 dias após a semeadura em água destilada. Os valores de atividade total dos extratos de cotilédones com 1, 3 e 4 dias após a semeadura foram 428, 3019 e 3954 UA x cot⁻¹ x h⁻¹, respectivamente. Os valores representam médias de 3 ensaios.



vada no tempo zero (Figura 25). Várias podem ter sido as causas pelas quais não se detectou a presença da suposta protease. Dentre algumas pode-se citar: (1) que a protease não existe; (2) que a protease não é ativa em pH 7,0 e (3) que a protease é muito instável e torna-se rapidamente inativa a 25°C. Para um melhor esclarecimento da questão, outras condições de extração e de incubação da mistura dos extratos necessitam ser testadas.

O comportamento decrescente da atividade ribonucleásica em condições controle, a partir do 5º dia de germinação (Figuras 5 e 8), permite aventar-se a possibilidade da existência de um inibidor da enzima a partir deste dia. Pode-se também supor que no tratamento salino este inibidor começa a ser formado somente depois do 7º dia após a semeadura, ponto onde a curva de atividade começa a decrescer (Figuras 5 e 8). Para investigar a possível existência do suposto inibidor, extratos de cotilédones de alta atividade foram misturados com aqueles de baixa atividade (cotilédones de plântulas com 7 e 9 dias de germinação em água destilada), conforme descrição na Figura 26. Os resultados apresentados mostraram que os valores de atividade ($\Delta A_{260} \times h^{-1}$) das misturas de extrato são aproximadamente iguais à soma dos valores de atividade dos extratos isoladamente. Portanto, não foi detectada a presença de inibidor de RNase nos extratos de cotilédones de 7 e 9 dias de germinação em água destilada. Este resultado reforça a idéia de que a RNase apresenta "turnover", exposta na discussão dos resultados com a cicloeximida, quando o decréscimo na curva de atividade com a germinação foi explicado como sendo devido ao predomínio do processo de degradação sobre o de síntese

FIGURA 26 - Atividade ribonucleásica da mistura de extratos () e soma dos valores de atividade dos extratos isoladamente (). Os valores em (A) referem-se a associação dos extratos de cotilédones de plântulas com 5 e 9 dias de germinação em água destilada; em (B) com 7 dias de germinação em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M e em (C) com 9 dias de germinação em água destilada e em solução de NaCl 0,1 M. Os valores de atividade total dos extratos de cotilédones de 5, 7 e 9 dias de germinação em água foram 3665, 2005 e 1602 UA x cot⁻¹ x h⁻¹ e de 7 e 9 dias de germinação em NaCl 0,1 M foram 5481 e 3309 UA x cot⁻¹ x h⁻¹, respectivamente. Os valores representam médias de 3 ensaios.



se da enzima.

7. Caracterização da isoenzima de RNase correspondente à banda principal.

Grande parte desse estudo foi realizado com o mesmo extrato usado no experimento com o rádioisótopo (Figura 24), onde foi observado que a atividade das bandas secundárias representava apenas uma parcela muito pequena da atividade total do extrato. Desse modo, os resultados obtidos com o uso desse extrato se aproximam bastante daqueles que seriam obtidos com a enzima no estado puro. Somente em um caso, que será oportunamente identificado, foi necessário o uso da enzima numa forma mais pura.

Alguns parâmetros foram analisados com a finalidade de classificar a enzima em estudo, num dos tipos estabelecidos por WILSON (1975), ou seja: RNase I, RNase II, nuclease I e exonuclease I. De acordo com o autor, as RNases são enzimas capazes de hidrolisar o RNA, mas não o DNA, enquanto que as nucleases agem tanto sobre um como o outro.

7.1. Capacidade de hidrolisar o DNA.

Com a finalidade de determinar se a enzima em estudo era uma RNase ou nuclease, ensaios de atividade enzimática foram realizados com o extrato bruto, tendo como substrato o DNA desnaturado. Em paralelo, ensaios de atividade ribonucleásica foram realizados, nas mesmas condições empregadas pa

ra o ensaio tendo como substrato o DNA. Os resultados apresentados na Tabela VII, mostraram total ausência de atividade de soxirribonucleásica, pelo menos em condições onde a atividade ribonucleásica foi alta. A enzima em estudo é, por conseguinte, uma RNase e não uma nuclease. A baixa sensibilidade ao EDTA mostrado na Tabela VII é uma característica geral apresentada pelas RNases de plantas, ao contrário das nucleases que são fortemente inibidas (WILSON, 1975).

Por outro lado, o $MgCl_2$ inibiu cerca de 12% da atividade ribonucleásica (Tabela VII), resultado que concorda com os observados em trigo (CHEVRIER & SARHAN, 1980), arroz (YOKOYAMA et al., 1982) e chá (IMAGAWA et al., 1982), onde também foram notados baixos níveis de inibição da RNase pelo íon magnésio. Há casos, no entanto, como em centeio, onde a atividade ribonucleásica foi fortemente inibida pelo $MgCl_2$ (KULIGOWSKA et al., 1980) ou, como em ervilha, onde foi observado um estímulo na atividade da enzima (HIRAI & ASAHI, 1975).

7.2. Curva de pH em presença e ausência de KCl.

De acordo com WILSON (1963) a RNase I (antiga RNase A) de escutelo de milho apresenta curva de pH com ótimo de atividade no valor 5,8, que muda para o valor 5,0 quando a curva é feita em presença de KCl 0,16 M. Já a RNase II (antiga RNase B) não sofre mudança no valor do pH ótimo pela presença de KCl, embora mostre um estímulo na atividade enzimática (WILSON, 1963). Em geral, as RNases I e II de plantas (principalmente de gramíneas) apresentam ótimos de pHs nas faixas de 5,0 a 6,0 e de 6,0 a 7,0, respectivamente (WILSON, 1975).

TABELA VII - Atividade enzimática de extratos de cotilédones de plântulas de feijão de corda pitiúba com 6 dias de germinação em NaCl 0,1 M, com relação aos substratos RNA e DNA, em presença de $MgCl_2$ e EDTA. Os valores representam médias de 3 ensaios.

Composto adicionado à mistura de reação	$\Delta A_{260} \times h^{-1}$	
	RNA	DNA
Controle*	0,744	0,000
$MgCl_2$ (69 mM)	0,654	0,000
EDTA (4 mM)	0,699	0,000

(*) Ensaio de atividade enzimática em ausência de $MgCl_2$ e EDTA.

Tendo em vista estas considerações, curvas de pH em presença e ausência de KCl, foram realizadas com extratos de cotilédones de feijão, numa tentativa de classificar a RNase em estudo num dos tipos proposto por WILSON (1975).

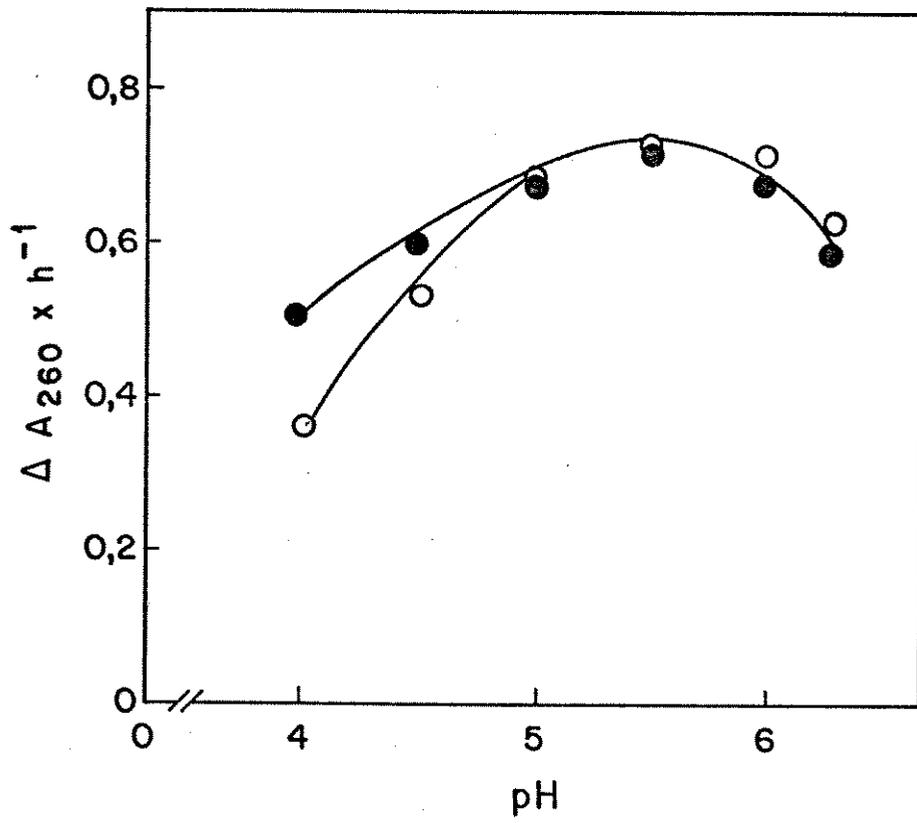
Para que o KCl alterasse prontamente a força iônica da mistura de reação, e daí pudesse modificar a curva de pH, o tampão de ensaio foi mudado para acetato-Na 0,1 M. Como pode ser observado na Figura 27, a enzima apresentou pequena variação em atividade devido a presença de KCl, tendo, portanto, comportamento diferente das RNases I e II de escutelo de milho (WILSON, 1963). Por outro lado, o pH ótimo apresentou-se dentro da faixa estabelecida por WILSON (1975) para as RNases I (Figura 27).

7.3. Identificação dos produtos de hidrólise resultantes da ação da RNase.

Tanto a RNase I como a RNase II hidrolisam o RNA por uma reação de transferência, produzindo os quatro 2':3'-nucleotídeos cíclicos (AMPC, GMPC, CMPC, e UMPC). Todavia, somente a RNase II é capaz de hidrolisar todos os nucleotídeos cíclicos, dando como produtos secundários os 3'-nucleotídeos, enquanto a RNase I pode hidrolisar apenas os nucleotídeos cíclicos das purinas (WILSON, 1975). Em busca de maiores informações acerca da enzima em estudo a fim de verificar a possibilidade de incluí-la num dos tipos proposto por WILSON (1975), foram determinados os produtos de hidrólise resultantes de sua ação sobre o RNA.

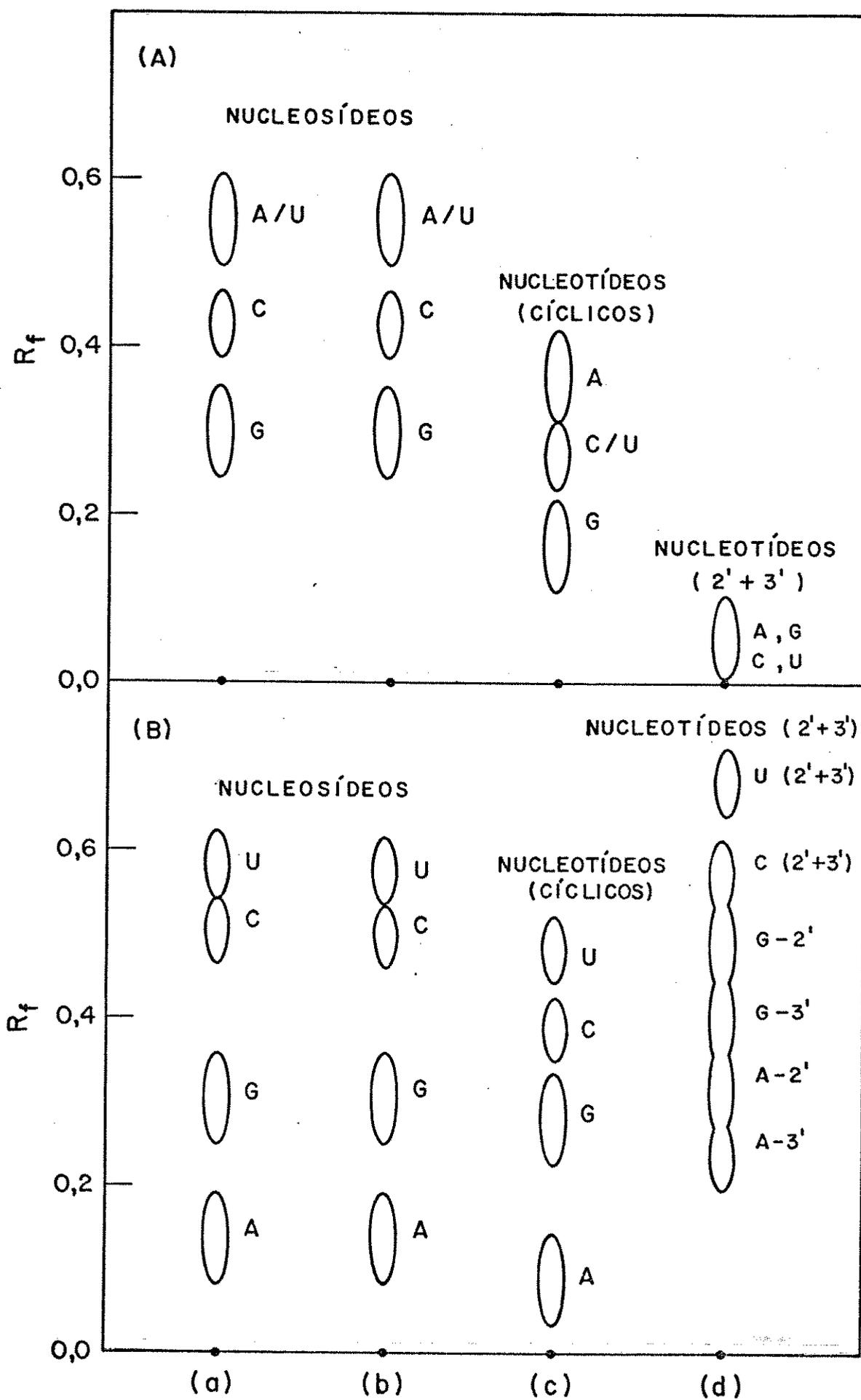
A cromatografia no solvente I do hidrolisado de RNA pelo extrato bruto durante 24 horas, provocou o aparecimento

FIGURA 27 - Curva de atividade ribonucleásica em função do pH, em ausência (O—O) e presença de KCl 0,16 M (●—●). O ensaio foi realizado com extrato de cotilédones de plântulas de feijão de corda pitíuba com 6 dias de germinação em NaCl 0,1 M. Os valores representam médias de 3 ensaios.



na placa de celulose, quando irradiada com luz ultravioleta, de 3 manchas escuras (Figura 28 A). Tais manchas foram identificadas como nucleosídeos por meio de comparação com padrões de nucleosídeos, e através da análise dos produtos resultantes da hidrólise da amostra com HCl 0,1 N por 30 min a 30°C. O tratamento com HCl é muito útil para diferenciar nucleosídeos de nucleotídeos cíclicos, pois alguns deles têm valores de R_f muito próximos neste solvente. Os nucleosídeos, ao contrário dos nucleotídeos cíclicos que são convertidos em misturas de 2' e 3'-nucleotídeos, não sofrem modificações pelo tratamento com HCl 0,1 N. Como mostrado na Figura 28 A, a cromatografia dos produtos de hidrólise do RNA tratados com HCl forneceu as mesmas 3 manchas anteriormente evidenciadas, confirmando portanto, que elas são nucleosídeos. A mancha com deslocamento mais veloz não pôde ser identificada com precisão, devido os nucleosídeos da adenina e da uracila possuem iguais velocidades de migração no solvente usado havendo, portanto, a possibilidade dela ser devida à presença de um dos dois nucleosídeos ou de ambos. As duas outras manchas, obviamente, são os nucleosídeos da guanina e citosina (Figura 28 A). Por outro lado, a cromatografia dos produtos de hidrólise do RNA resultantes da ação da enzima extraída de uma fatia de 1 mm de espessura do gel de poliacrilamida, localizada no centro da banda principal (enzima purificada) resultou também na formação de 3 manchas, porém, nesse caso, identificadas como sendo nucleotídeos cíclicos e não nucleosídeos (Figura 28 A). Como pode ser notado, a hidrólise química pelo HCl da amostra contendo esses nucleotídeos provocou o desaparecimento das 3 manchas anteriormente evidenciadas e em troca apareceu uma outra, próxima ao ponto de aplicação

FIGURA 28 - Cromatografia de camada delgada dos produtos de hidrólise do RNA no solvente I (A) e no solvente II (B). Na amostra (a) o RNA foi hidrolisado pelo extrato bruto (cotilédones de plântulas de feijão com 6 dias de germinação em NaCl 0,1 M) e na (b) pela isoenzima de RNase correspondente à banda principal. As amostras (c) e (d) são aquelas (a) e (b) tratadas com HCl 0,1 N, respectivamente. Nomenclatura: A = adenina; C = citosina; G = guanina e U = uracila.



da amostra (Figura 28 A). Essa mancha representa a mistura dos 2' e 3'-nucleotídeos formados pela hidrólise ácida dos nucleotídeos cíclicos, os quais têm baixa mobilidade no solvente I. A mancha de mobilidade intermediária pode ser um dos dois nucleotídeos cíclicos das pirimidinas ou ambos (Figura 28 A), pois esses dois nucleotídeos têm velocidades de migração muito próximas no solvente I, sendo portanto difícil de serem separados.

A cromatografia no solvente II do hidrolisado de RNA pelo extrato bruto revelou a presença de quatro manchas de nucleosídeos na placa de celulose (Figura 28 B). É óbvio, portanto, que a mancha de nucleosídeo de maior velocidade evidenciada no solvente I corresponde aos nucleosídeos da adenina e uracila. Também a cromatografia no solvente II do hidrolisado de RNA pela enzima purificada mostrou a existência de quatro manchas de nucleotídeos cíclicos, demonstrando que a mancha de nucleotídeo cíclico de velocidade intermediária observada no solvente I foi devida aos dois derivados das pirimidinas (Figura 28 B). Embora a cromatografia no solvente II tenha sido muito útil na identificação de todos os nucleosídeos ou nucleotídeos cíclicos, a identificação da mistura dos 2' e 3'-nucleotídeos não pôde ser feita com muita clareza, pois a mistura desses compostos provocou o aparecimento na placa de manchas superpostas e de difícil reconhecimento (Figura 28 B). A razão disso deve-se ao fato da hidrólise química dos quatro nucleotídeos cíclicos resultar numa mistura contendo 8 nucleotídeos com o fostato na posição 2' ou 3', que têm valores de R_f s próximos sendo, conseqüentemente, difícil de serem separados. Na Figura 28 B é indicada a posição aproximada desses nu

cleotídeos. Por outro lado, no solvente I, a mistura dos 2' e 3'-nucleotídeos foi fácil de ser identificada, pois formou-se apenas uma única mancha próxima ao ponto de aplicação. Portanto, para uma melhor identificação dos nucleotídeos cíclicos foi necessário o emprego dos dois sistemas de solventes.

O fato dos produtos de hidrólise do RNA, pelo extrato bruto, serem nucleosídeos e não nucleotídeos cíclicos, como era de se esperar para as RNases (WILSON, 1975) deve-se provavelmente à presença de fosfatases (ou nucleotidasas) no extrato, que hidrolisam o fosfato dos nucleotídeos produzindo os nucleosídeos. Evidência disso foi obtida quando reduziu-se o tempo de hidrólise do RNA pelo extrato bruto para 2 horas, sendo nesse caso observado apenas a presença dos nucleotídeos cíclicos na placa de celulose (resultados não apresentados.)

As manchas correspondentes aos nucleotídeos cíclicos das purinas apresentaram-se, de um modo geral, com intensidades maiores que as das pirimidinas (Figura 28 B). Este fato foi observado mesmo para tempos de hidrólise pequenos, onde o RNA não havia sido totalmente digerido, sugerindo, portanto, uma maior preferência da RNase em hidrolisar ligações fosfodiéster do RNA entre nucleotídeos derivados das purinas. De acordo com WILSON (1975) as RNases liberam os nucleotídeos das purinas mais rapidamente que os da pirimidina. É possível, no entanto, que a preferência em liberar os nucleotídeos das purinas seja apenas devido a uma maior proporção deles na estrutura do RNA empregado no ensaio, do que propriamente a uma maior especificidade por esses nucleotídeos. Para esclarecimento da questão informações acerca da estrutura do RNA são necessárias.

Não observou-se a presença de 3'-nucleotídeos nas cromatografias dos hidrolisados enzimáticos do RNA (Figura 28). Portanto, a RNase em estudo não formou os produtos secundários apontados por WILSON (1975) como característicos das RNases I e II.

IV - DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

No presente estudo, utilizando-se sementes do feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), foi verificado que a presença de NaCl no meio de germinação reduziu a absorção de água pelas plântulas e inibiu a mobilização e/ou o transporte das reservas cotiledonárias para o eixo embrionário, sugerindo serem tais efeitos os responsáveis pela forte redução no crescimento (Figuras 1, 2, 3, 6 e 7). Efeitos semelhantes, porém ligeiramente mais intensos, foram observados quando as sementes foram semeadas em solução de manitol, tendo o mesmo potencial da água que aquele da solução de NaCl (Figuras 1, 2, 3, 6 e 7). Este fato sugere que o estresse hídrico (um dos componentes do estresse salino) imposto pelo NaCl foi, provavelmente, o principal fator relacionado com a inibição do crescimento. Resultados semelhantes foram observados por outros autores quando estudaram os efeitos do NaCl e do manitol na germinação de sementes e/ou no desenvolvimento das plântulas (UHVITS, 1946; PRISCO & O'LEARY, 1970a; PRISCO & VIEIRA, 1976; MACHADO et al., 1976; SHEORAN & GARG, 1978; CASTRO, 1982; GOMES FILHO et al., 1983; KAWASAKI et al., 1983).

Pode-se supor que o efeito inibitório do NaCl, *in vivo*, sobre a atividade ribonucleásica nos primeiros dias de germinação (Figuras 5 e 8), contribuiu, pelo menos em parte, para a inibição do processo germinativo. Em apoio a esta ideia, foi observado em *Vigna sinensis* (VIEIRA, 1975) e em *Vigna unguiculata* (GOMES FILHO et al., 1983) que o NaCl, ao inibir

a atividade ribonucleásica nos cotilédones, causava, simultaneamente, uma inibição na mobilização do RNA. É possível, em consequência disso, que menos nucleotídeos sejam translocados para o eixo embrionário, local onde provavelmente são utilizados para dar origem a outros RNAs. Portanto, uma inibição na atividade da RNase nos cotilédones pode afetar o processo de síntese protéica no eixo embrionário e, desta forma, causar uma inibição no crescimento da plântula. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade do aumento de atividade da RNase ser uma consequência, e não um dos fatores necessários para que o processo germinativo ocorra. Desta forma o sal, ao inibir o processo germinativo, poderia retardar o aumento da atividade desta enzima.

O fato da atividade ribonucleásica no tratamento salino não ter diferido daquela no tratamento com manitol, até o 3º dia após a sementeira (Figuras 5 e 8), sugere que a inibição observada na atividade da RNase neste período deveu-se, principalmente, ao componente osmótico do estresse salino. Todavia, como depois deste dia a atividade ribonucleásica no tratamento salino se mostrou muito superior àquela no tratamento com manitol, pode-se pensar na existência de um efeito específico do sal no interior da célula (Figuras 5 e 8). É conveniente ressaltar que neste mesmo período as diferenças em crescimento das plântulas nos dois tratamentos foram relativamente pequenas (Figura 6). Neste caso, fica descartada a possibilidade do aumento na atividade da RNase ser devida a outros fatores, que não aquele específico do sal. Entretanto, parece que este alto nível de atividade da RNase nos cotilédones não foi capaz de superar os efeitos inibitórios da salinidade nos primeiros dias de germinação. Embora, aparentemente, es

se alto nível da RNase nos órgãos de reserva favoreça uma melhor mobilização do RNA, tal fato não foi evidenciado por GOMES FILHO et al. (1983). Esta observação parece reforçar a dúvida levantada anteriormente quanto ao papel desempenhado por esta enzima no processo germinativo e sugere que a RNase e o RNA estão localizados, pelo menos parcialmente, em compartimentos diferentes. De acordo com WILSON (1982), é possível mas ainda não provado, que as nucleases estejam localizadas em compartimentos tais como o vacúolo e os corpos protêicos.

Uma análise mais profunda da questão requer informações adicionais acerca do que acontece com a atividade da RNase em outras partes da plântula em condições de salinidade. É possível, por exemplo, que nos tecidos em crescimento a atividade da RNase também aumente e, neste caso, possa prejudicar o processo de síntese protêica por favorecer a destruição dos RNAs. A esse respeito, SHEORAN & GARG (1978) observaram que, até o 4º dia de germinação em presença de NaCl, enquanto que nos cotilédones, a atividade dessa enzima se encontrava fortemente inibida, e obviamente mobilizando menos RNA, no eixo embrionário e folhas primárias ela apresentava níveis de atividade mais elevados que o controle, numa condição que também concorre para a redução no crescimento do órgão. Infelizmente o estudo feito por esses autores foi realizado apenas no período em que a atividade da RNase nos cotilédones se encontra va inibida pela salinidade, impossibilitando uma melhor análise da hipótese aqui exposta, de que as vantagens do alto nível da RNase nos cotilédones poderiam ser sobrepujadas pelos elevados níveis da enzima nos tecidos em crescimento. Aumentos de atividade ribonucleásica nas folhas como consequência da salinidade também foram observados por ARAD & RICHMOND (1973)

em plântulas de *Hordeum vulgare*.

Um comportamento semelhante ao aqui encontrado para a RNase foi também observado para as enzimas α e β -amilases de cotilédones de *Vigna unguiculata* provenientes de plântulas germinadas em presença de NaCl (PRISCO et al., 1981). Esses autores observaram que as amilases eram inibidas pelo sal até por volta do 5º dia de germinação, porém a partir daí o sal estimulava as atividades dessas enzimas. Além disso, da mesma forma que para o caso da RNase, o aumento de atividade dessas enzimas não favoreceu uma melhor mobilização do amido.

Pelo menos 6 bandas de isoenzimas de RNase foram evidenciadas nos extratos de cotilédones de feijão durante a germinação (Figura 10). As de menores intensidades (bandas secundárias) tenderam a desaparecer com a germinação, enquanto que uma delas, praticamente inexistente na semente quiescente, aumentou fortemente de intensidade com a germinação (banda principal). Comportamento semelhante a este foi observado para as isoenzimas de RNase de cotilédones de *Vigna radiata* (CHAPPELL et al., 1980), citado por WILSON (1982). A presença de isoenzimas de RNase em sementes e/ou em órgãos de reserva durante a germinação foi também evidenciada por outros autores em *Zea mays* (WILSON, 1969, 1971), *Pisum sativum* (BRYANT et al., 1976b) *Phaseolus aureus* (JACOBSEN, 1980) e em *Hordeum vulgare* (PIETRZAK et al., 1980). Embora em nenhum desses casos tenha sido evidenciada alguma função específica para cada uma dessas isoenzimas isoladamente, WILSON (1975) apontou a existência de diferentes modos de ação enzimática entre elas, o que sugere que tenham significado biológico.

O efeito inibitório do NaCl sobre a atividade ribo

nucleásica nos primeiros dias de germinação, observado nas Figuras 5 e 8, foi decorrente da redução de atividade da isoenzima correspondente à banda principal (Figuras 10, 11 e 12). Por outro lado, os altos níveis de atividade evidenciados nos dias 7 e 9 de germinação sob condições de salinidade (Figuras 5 e 8) foram devidos, principalmente, aos aumentos de atividade dessa mesma isoenzima (Figuras 10, 11 e 12). Os resultados sobre os efeitos do NaCl nas isoenzimas de RNase mostram que este sal causa apenas modificações nas intensidades de suas bandas, especialmente na daquela correspondente à banda principal, não tendo sido observado, portanto, quaisquer alterações quanto ao número de bandas de isoenzimas nos extratos de cotilédones.

Em um estudo semelhante a este, porém relacionado com a mobilização de amido nos cotilédones de *Vigna unguiculata*, (CASTRO, 1982) observou que a salinidade não provocou o aparecimento de nenhuma nova forma de isoenzima de amilases ou de fosforilases, no que diz respeito à mobilidade eletroforética. A autora sugere que o NaCl apenas causou uma diminuição na provável síntese *de novo* de algumas das isoenzimas de α -amilase.

Por outro lado, alterações não apenas quantitativas mas também qualitativas nas isoenzimas de RNase de plântulas de *Vigna sinensis*, foram observadas por KAPOOR & SACHAR (1976), porém resultantes da presença de GA_3 (ácido giberélico) e AMPc (3':5'-adenosina-monofosfato-cíclico) no meio de germinação. Esses autores verificaram que o estímulo na atividade ribonucleásica causado por esses compostos foi acompanhado, não só por um aumento nas intensidades de algumas das isoenzimas, mas

também pelo surgimento de outras.

Não foram observadas diferenças qualitativas entre as isoenzimas de RNase de extratos de cotilédones dos tratamentos salino e com manitol (Figura 17), provenientes de plântulas no 7º dia após a sementeira, ponto onde foi maior a diferença entre os valores de atividade nos dois tratamentos (Figuras 5 e 8). A principal diferença observada foi apenas quanto à intensidade da isoenzima correspondente à banda principal, que se mostrou muito maior no tratamento salino, confirmando ser o efeito específico do sal o de causar apenas um estímulo na atividade dessa isoenzima.

Os resultados dos experimentos com cicloeximida (Tabelas III e V, Figuras 20 e 21) mostraram claramente que o aumento da atividade ribonucleásica durante a germinação foi dependente em grande parte do processo de síntese protéica. Embora alguns autores (BENNETT & CHRISPPEELS, 1972; BRYANT *et al.*, 1976a, 1976b; KAPOOR *et al.*, 1976) tenham também observado ser o aumento da atividade da RNase total ou parcialmente dependente da síntese *de novo* de proteínas, os experimentos por eles realizados foram conduzidos deixando-se as plântulas germinarem durante todo o tempo em presença do inibidor de síntese protéica. O inconveniente disto está no fato aqui evidenciado, de que nestas condições o crescimento das plântulas ter se apresentado fortemente reduzido, deixando, portanto, dúvidas sobre o efeito observado na enzima ser apenas uma decorrência do retardamento no processo germinativo. No nosso caso, o experimento foi conduzido de tal modo que o efeito foi observado sobre a RNase, sem que se tivessem notado alterações importantes no crescimento das plântulas causadas pelo inibidor.

Em consequência do tratamento dos cotilédones com a cicloeximida, observou-se uma redução na intensidade da isoenzima correspondente à banda principal, sugerindo, dessa forma, que o aumento de atividade dessa isoenzima durante a germinação é dependente do processo de síntese protéica (Figura 22). Efeito semelhante da cicloeximida sobre uma das duas isoenzimas de RNase, presentes nos cotilédones de ervilha no 5º dia de germinação, foi evidenciado por BRYANT et al. (1976b).

O fato do aumento da atividade ribonucleásica com a germinação depender do processo de síntese protéica não implica, necessariamente, que ocorra síntese *de novo* da molécula da enzima. É possível que a enzima preexista na semente quiescente numa forma inativa, e que durante a germinação seja sintetizada *de novo* uma protease que a ativaria. Entretanto, os experimentos realizados incubando-se extratos de alta atividade com aqueles de baixa atividade não evidenciaram a presença dessa suposta enzima (Figura 25). Do mesmo modo, os experimentos onde foram misturados extratos de baixa atividade, oriundos de cotilédones de 7 e 9 dias de germinação em água destilada, com aqueles de alta atividade (Figura 26), também não revelaram a presença do inibidor da RNase, supostamente responsável pelo decréscimo nas curvas de atividades (Figuras 5 e 8). Este fato concorda com a idéia de que a RNase apresenta "turnover" sendo, portanto, provável que o decréscimo nos valores de atividade da curva no controle após o 5º dia de germinação, possa ser melhor explicado como devido ao predomínio do processo de degradação sobre o de síntese, e não como sendo devido à uma simples interrupção do processo de síntese. Em apoio a esta idéia, SACHER et al. (1975) demonstraram a existência do

processo de "turnover" para o caso da RNase induzida por injúria mecânica nos tecidos de nabo.

Embora os experimentos realizados com o radioisótopo não tenham revelado incorporação de marcação na isoenzima de RNase correspondente à banda principal (Figura 24), isto não se constitui em prova de que ela não seja sintetizada *de novo* durante a germinação. Pode acontecer que o aumento de atividade dessa isoenzima com a germinação seja consequência apenas da formação de um baixo número de moléculas, e/ou que o teor de leucina na cadeia polipeptídica seja baixo, de modo que o nível de radioatividade incorporada na molécula tenha sido muito baixo para ser detectado pela técnica empregada.

Mesmo não tendo sido detectada incorporação de marcação na molécula de RNase, os resultados dos experimentos com cicloeximida, juntamente com aquele onde não foi evidenciado a presença da suposta protease ativadora da RNase, sugerem ser o aumento de atividade ribonucleásica com a germinação devido à síntese *de novo* da enzima. É provável, por conseguinte, que a isoenzima correspondente à banda principal seja sintetizada *de novo*, pois esta isoenzima foi a única a ser inibida pela cicloeximida, além de representar quase toda a atividade do extrato de cotilédones no 6º dia de germinação no sal (Figura 24), um dos dias onde a atividade é mais alta (Figuras 5 e 8).

Os resultados apresentados nas Figuras 5 e 8 sugerem, portanto, que a salinidade inibe a síntese *de novo* da RNase nos primeiros dias de germinação, período onde predomina o fator osmótico do estresse salino na enzima, e que estimula sua síntese nos últimos dias do período estudado, onde se destaca o efeito específico do sal, decorrente, possivelmente,

do excesso de íons no interior das células.

Os resultados apresentados sobre a caracterização da RNase de cotilédones de feijão (Tabela VII, Figuras 27 e 28) são suficientes para classificá-la como uma RNase "verdadeira", no sentido dela não ser capaz de agir sobre o DNA. Por outro lado, não é possível incluir a RNase em estudo num dos tipos proposto por WILSON (1975), pois, embora a enzima tenha apresentado propriedades de RNase I (ótimo de pH), o KCl não foi capaz de alterar significativamente a curva de pH, uma outra característica da RNase I apontada por WILSON (1963). Por outro lado, apesar de formar os nucleotídeos cíclicos, característica comum aos dois tipos de RNases, não observou-se, pelo menos no tempo máximo de hidrólise testado (24 horas), a formação de produtos secundários do tipo 3'-nucleotídeos, apontados por WILSON (1975) como comuns às RNases. É importante ressaltar, no entanto, que a maior parte das referências utilizadas por WILSON (1975) para estabelecer sua classificação, são provenientes de trabalhos realizados com plantas pertencentes à família das gramíneas, que obviamente apresentam diferenças com relação às das leguminosas.

V - RESUMO

O presente estudo trata da ação do NaCl e do manitol como substâncias com propriedades iônicas e osmóticas sobre o processo germinativo e na atividade ribonucleásica, em sementes de feijão de corda pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), tendo sido dado um enfoque especial aos efeitos do sal nas isoenzimas de RNase. Investigou-se, também, se o aumento de atividade ribonucleásica com a germinação era devido a uma síntese *de novo* da enzima ou a sua ativação.

Determinou-se o efeito do NaCl e do manitol no processo germinativo através das medidas de peso fresco e seco dos cotilédones, do sistema radicular e da parte aérea, e de comprimento da raiz principal e da parte aérea de plântulas provenientes de sementes semeadas em água destilada (tratamento controle), e em soluções isosmóticas (-4,6 bar) de NaCl (tratamento salino) e de manitol (tratamento osmótico). Os resultados apresentados sugerem que a presença de NaCl ou de manitol no meio de germinação inibe a mobilização e/ou o transporte das reservas cotiledonárias para as outras partes da plântula, causando, em consequência, uma redução no crescimento.

Estudou-se o efeito do NaCl e do manitol na atividade de ribonucleásica em extratos de cotilédones de plântulas dos tratamentos controle, salino e com manitol. Verificou-se que tanto o NaCl como o manitol inibiram a atividade da RNase durante os primeiros dias de germinação, porém, nos últimos dias do período de germinação estudado, observou-se um estímulo na atividade da RNase, que pareceu ter ocorrido em consequência de um efeito específico do NaCl no interior das células.

Determinaram-se as isoenzimas de RNase através de e letroforese em gel de poliacrilamida em extratos de cotilédones de plântulas dos 3 tratamentos. Os padrões de isoenzimas de RNase nos tratamentos controle e salino foram determinados ao longo do processo germinativo, enquanto que aquele no manitol foi determinado apenas no 7º dia de germinação. Pelo menos 6 bandas de isoenzimas de RNase foram evidenciadas nos géis. Uma dessas bandas, praticamente inexistente nos extratos de se mentes quiescentes, aumenta muito de intensidade com a germina^{ção} (banda principal), enquanto que as outras, presentes nestes extratos, são de intensidades muito baixas (bandas secundárias) e apresentam tendência de se tornarem com intensidades menores ou de desaparecerem com a germinação. Os resultados sugerem que a atividade da banda principal durante a germinação repre senta quase toda a atividade do extrato. O estresse causado pe^{lo} manitol ou NaCl não provocou o aparecimento de novas formas de isoenzimas de RNase, sendo detectadas apenas algumas modifi^{cações} em suas intensidades, especialmente na daquela corres pondente à banda principal. O efeito observado sobre esta iso^{enzima} foi muito semelhante àquele verificado para a atividade ribonucleásica no extrato bruto.

O tratamento dos cotilédones com cicloeximida inibiu o aumento da atividade ribonucleásica com a germinação, princi palmente porque inibiu o aumento de intensidade da isoenzima correspondente à banda principal. Embora não tenha sido detec tada incorporação de leucina-1-C-14 na molécula dessa isoenzima, o insucesso na tentativa de se encontrar um ativador da enzi ma, através da incubação de extratos de alta atividade com a queles de baixa atividade, sugere que essa isoenzima é sinteti zada *de novo* durante a germinação.

Sugere-se então que a salinidade inibe a síntese *de novo* da isoenzima de RNase correspondente à banda principal no início do processo germinativo, justamente na fase em que predomina o componente hídrico do estresse salino, e que estimula a sua síntese, naquela fase em que predomina o efeito específico (iônico) do sal.

A enzima em estudo é uma RNase e não uma nuclease, pois observou-se total ausência de atividade desoxirribonucleásica dos extratos, em condições de ensaio onde foi alta a atividade ribonucleásica. Curvas de pH em presença e ausência de KCl, e identificação dos produtos de hidrólise resultantes da ação da RNase sobre o RNA, foram realizadas no sentido de classificar a enzima em estudo num dos tipos propostos por WILSON (1975). A enzima não apresentou as características necessárias para que pudesse ser considerada como do tipo RNase I ou RNase II.

VI - SUMMARY

(EFFECTS OF SALINITY ON RIBONUCLEASE ACTIVITY OF COTYLEDONS OF *Vigna unguiculata* (L) WALP CV PITIÚBA DURING GERMINATION)

The present study concerns the action of NaCl and mannitol on the process of germination and RNase activity, in seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) cv pitiúba, with special attention to the effect of salt on RNase isoenzymes. An investigation was also carried out to explain whether the increase in RNase activity during germination was due to *de novo* protein synthesis or enzyme activation.

The effect of salt and mannitol on the process of germination was evaluated through fresh and dry weight measurements of the cotyledons, roots and aerial parts, as well as the lengths of the main root and aerial parts, of seedlings grown in water (control) and iso-osmotic solutions (-4.6 bar) of NaCl (salt treatment) and mannitol (osmotic treatment). The results suggest that the presence of salt or mannitol during germination inhibits the mobilization and/or transport of the cotyledonary reserves to other parts of the seedlings, resulting in a reduction of growth.

The effect of NaCl and mannitol was studied on the activity of RNase in cotyledon extracts of seedlings. It was found that both salt and mannitol inhibited RNase activity over the first few days of germination, but at later stages NaCl caused a marked increase in RNase activity whereas mannitol did not. This suggests a specific effect of NaCl within the cell.

An investigation of RNase isoenzymes was made by polyacrylamide gel electrophoresis of cotyledon extracts of all three treatments. The RNase isoenzyme patterns in the control and salt treatment were determined throughout germination, whereas for mannitol this was determined on the 7th day only. At least 6 bands of RNase activity could be detected in the gels. One of these bands, virtually absent in the seeds before germination increased tremendously during germination ("main band"), whereas the others were of low intensity ("secondary bands") and tended to diminish or even disappear during germination. The data suggest that the main band represents virtually all the RNase activity that appears during germination. The stress caused by NaCl or mannitol did not lead to the appearance of any new bands; only modifications in intensity of existing bands were observed, especially with the main one. The effect on this band was very similar to that seen for total RNase activity of the crude extract.

Treatment of the cotyledons with cycloheximide inhibited the increase in RNase activity occurring during germination, principally through an effect on the main band. Although it was not possible to demonstrate the incorporation of ^{14}C -leucine in the main isoenzyme molecule, the failure to detect an enzyme activator by mixing high and low activity extracts suggests that this main isoenzyme is synthesized *de novo* during germination.

It is suggested that salinity inhibits the *de novo* synthesis of the main RNase isoenzyme during the initial stages of germination, when the osmotic effect of salinity predominates, and that it stimulates its synthesis at later stages when a specific (non-osmotic) effect of salt

predominates.

The enzyme under study was shown to be a true RNase and not a nuclease, since no DNase activity could be detected. Identification of the RNA hydrolysis products of the enzyme and pH curves in the presence and absence of KCl were conducted in order to classify the enzyme according to WILSON (1975). However, the enzyme did not present the necessary characteristics for it to be considered as a RNase I or RNase II type.

VII - ABREVIATURAS

A_{260}	-	absorbância medida em 260 nm.
ΔA_{260}	-	diferença de absorbância medida em 260 nm.
A_{580}	-	absorbância medida em 580 nm.
DMS	-	diferença mínima significativa.
DNA	-	ácido desoxirribonucléico.
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético.
MES	-	ácido 2 (N-morfolino) etanosulfônico.
POPOP	-	1,4-bis [2-(4 metil-5-feniloxazolil)]-benzeno.
PPO	-	difeniloxazole.
R_f	-	mobilidade eletroforética ou cromatográfica.
RNA	-	ácido ribonucléico.
RNase	-	ribonuclease.
SDS	-	sódio dodecil sulfato.
TCA	-	ácido tricloroacético.
Tris	-	tris-(hidroximetil) aminometano.
UA	-	unidade de atividade.
Ψ	-	potencial da água.

VIII - LITERATURA CITADA

- ABADOM, P. N. & D. ELSON. 1970. A procedure for isolating transfer ribonucleic acid from human placenta. Biochim. Biophys. Acta, 199: 528-531.
- ABDEL WAHAB, A. M. & H. H. ZAHRAN. 1981. Effects of salt stress on nitrogenase activity and growth of four legumes. Biol. Plant., 23: 16-23.
- ANDREWS, A. T. 1981. Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications. Eds. A. R. Peacocke & W. F. Harrington. Clarendon Press - Oxford. p. 42.
- ARAD, S. & A. E. RICHMOND. 1973. RNase activity in barley leaves in relation to leaf-water content. II. Isr. J. Bot. 22: 208.
- ARRUDA, P. 1982. O potencial osmótico em mutantes de endosperma de milho e sua interação com características físicas e com a atividade da RNase da semente. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas - Campinas, SP.
- AYERS, A. D., J. W. BROWN & C. H. WADLEIGH. 1952. Salt tolerance of barley and wheat in soil plots receiving several salinization regimes. Agron. J., 44: 307-310.
- BARKER, G. R. & J. A. HOLLINSHEAD. 1967. The degradation of ribonucleic acid in the cotyledons of *Pisum arvense*. Biochem. J., 103: 203-237.

- BARKER, G. R., C. M. BRAY & T. J. WALTER. 1974. The development of ribonuclease and acid phosphatase during germination of *Pisum arvense*. Biochem. J., 142: 211-219.
- BAUMGARTNER, B. & PH. Matile. 1977. Isoenzymes of RNase in senescing morning glory petals. Z. Pflanzenphysiol., 82: 371-374.
- BEEVERS, L. & F. S. GUERNSEY. 1966. Changes in some nitrogenous components during the germination of pea seeds. Plant Physiol., 41: 1455-1458.
- BELOVA, L. P., N. N. MAKSYUTOVA & I. A. TARCHEVSKII. 1978. Effects of chloramphenicol and cycloheximide on synthesis of proteins of different fractions in wheat. Soviet Pl. Physiol., 25: 183-187.
- BENNETT, P. A. & M. J. CHRISPEELS. 1972. *De novo* synthesis of ribonuclease and β -1,3-glucanase by aleurone cells of barley. Plant Physiol., 49: 445-447.
- BEWLEY, J. D. & M. BLACK, 1978. Physiology and Biochemistry of Seeds. Vol. I. Springer-Verlag, New York, pp 1-6.
- BLACK, C. A. 1968. Soil-Plant Relationships. John Wiley & Sons, New York, 792 p.
- BOYER, J. S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. Plant Physiol., 46: 233-235.

- BRYANT, J. A., S. C. GREENWAY & G. A. WEST. 1976a. Development of nuclease activity in cotyledons of *Pisum sativum* L. Planta, 130: 137-140.
- BRYANT, J. A., S. C. GREENWAY & G. A. WEST. 1976b. Iso-enzymes of acid ribonuclease in cotyledons of *Pisum sativum* L. Planta 130: 141-144.
- CASTRO, M. A. R. 1982. Efeitos da salinidade na atividade de enzimas responsáveis pela mobilização de amido durante a germinação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. pitiúba. Disserertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará - Fortaleza, CE.
- CHEVRIER, N. & F. SARHAN. 1980. Partial purification and characterization of two RNases and one nuclease from wheat leaves. Plant Sci. Lett., 19: 21-31.
- CHRAMBACH, A., R. A. REISFELD, M. WYCKOFF & J. ZACCARI. 1967. A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 20: 150-154.
- DAVIS, B. J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 404-427.
- EL-FOULY, M. M. & J. JUNG. 1972. Enzyme activity in wheat seedlings grown under different NaCl salinity levels and their interaction with growth regulators. Biochem. Physiol. Pflanz. 163: 492-498.

- EPSTEIN, E., J. D. NORLYN, D. W. RUSH, R. W. KINGSBURY, D. B. KELLEY, G. A. CUNNINGHAM & A. F. WRONA. 1980. Saline culture of crops: A genetic approach. Science, 210: 399-404.
- FLOWERS, T. J., M. E. WARD & J. L. HALL. 1976. Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima*: some properties of malate dehydrogenase. Phit. Trans. R. Soc. Lond. B., 273: 523-540.
- FLOWERS, T. J., P. F. TROKE & A. R. YEO. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol., 28: 89-121.
- GOA, J. 1953. A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5: 218-222.
- GOMES FILHO, E & J. T. PRISCO. 1978. Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on the proteolytic activity of *Vigna sinensis* (L.) Savi cotyledons during germination. Rev. Bras. Bot., 1: 83-88.
- GOMES FILHO, E., J. T. PRISCO, F. A. P. CAMPOS & J. ENEAS FILHO. 1983. Effects of NaCl salinity *in vivo* and *in vitro* on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. Physiol. Plant., 59: 183-188.
- GOPAL, G. R. & G. R. RAO. 1982. Salt effect on *in vivo* activity of nitrate reductase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. Turrialba, 32: 216-218.

- GREENWAY, H. & R. MUNNS. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Ann. Rev. Plant Physiol., 31: 149-190.
- GREENWAY, H. & C. B. OSMOND. 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. Plant Physiol. 49: 256-259.
- HASON-PORATH, E. & A. POLJAKOFF-MAYBER. 1969. The effect of salinity on the malic dehydrogenase of pea roots. Plant Physiol. 44: 1031-1034.
- HIRAI, M. & T. ASAHI. 1975. Purification and properties of two ribonucleases in different intracellular compartments in pea root tissue. J. Biochem., 78: 485-492.
- HORIKOSHI, M. & Y. MORITA. 1981. Effect of cycloheximide on protein breakdown in germinating rice seeds. Agric. Biol. Chem., 45: 527-529.
- HSIAO, T. C. 1973. Plant responses to water stress. Ann. Rev. Plant Physiol., 24: 519-570.
- IMAGAWA, H., H. TORYU, T. OZAWA & Y. TAKINO. 1982. Purification and characterization of nucleases from tea leaves. Agric. Biol. Chem., 46: 1261-1269.
- JACOBSEN, H. J. 1980. Analysis of RNase isozymes in germinating pea cotyledons by polyacrylamide-gel electrophoresis. Plant Cell Physiol. 21: 659-665.
- KAHANE, I. & A. POLJAKOFF-MAYBER. 1968. Effect of substrate salinity on the ability for protein synthesis in pea roots. Plant Physiol., 43: 1115-1119.

- KALIR, A. & A. POLJAKOFF-MAYBER. 1976. Effect of salinity on respiratory pathways in root tips of *Tamarix tetragyna*. Plant Physiol., 57: 167-170.
- KAPOOR, H. C. & R. C. SACHAR. 1976. Stimulation of ribonuclease activity and its isoenzymes in germinating seeds of cowpea (*Vigna sinensis*) by gibberellic acid and adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. Experientia 32: 558-560.
- KAWASAKI, T., T. AKIBA & M. MORITSUGU. 1983. Effects of high concentrations of sodium chloride and polyethylene glycol on the growth and ion absorption in plants. Plant Soil., 75: 75-85.
- KRAMER, P. J. 1969. Plant & Soil Water Relationships. A modern synthesis. Mc Graw-Hill Book Company, New York pp. 14-16.
- KULIGOWSKA, E., D. KLARKOWSKA & J. W. SZARKOWSKI. 1980. An acid ribonuclease from rye germ cytosol. Phytochemistry, 19: 31-35.
- LANG, A. R. G. 1967. Osmotic coefficients and water potentials of sodium chloride solutions from 0 to 40°C. Aust. J. Chem., 20: 2017-23.
- MACHADO, R. C. R., A. B. RENA & C. VIEIRA. 1976. Efeito da desidratação osmótica na germinação de sementes de vinte cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) L. Rev. Ceres, 128: 310-320.

- MAYER, A. M. & A. POLJAKOFF-MAYBER. 1963. The Germination of Seeds. Pergamon Press, New York, 236 p.
- MOORE, S & W. H. STEIN. 1973. Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease. Science, 180: 458-464.
- MOSS, B. & V. M. Ingram. 1965. The repression and induction by thyroxin of hemoglobin synthesis during amphibian metamorphosis. Biochemistry, 54: 967-974.
- O'LEARY, J. W. 1971. Physiological basis for plant growth inhibition due to salinity. In: Food, fiber, and the arid lands. Mc Ginnies, W. G., B. J. Goldman & P. Paycore (eds.), AAAS & Univ. of Arizona Press., p. 331-336.
- ONG, H. T. 1980. Effects of actinomycin D, cycloheximide and kinetin on ribonuclease and beta-fructofuranosidase in water stressed tomato cotyledons. Biol. Plant., 22: 245-248.
- PALMIANO, E. P. & B. O. JULIANO. 1972. Biochemical changes in the rice grain during germination. Plant Physiol. 49:751-756.
- PIETRZAK, M., H. CUDNY & M. MALUSZYNSKI. 1980. Purification and properties of two ribonucleases and a nuclease from barley seeds. Biochim. Biophys. Acta. 614: 102-112.
- PIZARRO, F. 1975. Salinidade en los Perímetros Irrigados del Nordeste de Brasil. Trabalho apresentado no III Seminário de Irrigação e Drenagem. Fortaleza, Ceará. (Mimeografado). 27p.

- PORATH, E. & A. POLJAKOFF-MAYBER, 1968. Effect of salinity in the growth medium on carbohydrate metabolism in pea root tips. Plant Cell Physiol., 9: 195-203.
- PRISCO, J. T. 1980. Alguns aspectos da fisiologia do "stress" salino. Rev. Bras. Bot. 3: 85-94.
- PRISCO, J. T. & J. W. O'LEARY, 1970a. Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of *Phaseolus vulgaris* L. seeds Turrialba 20: 177-184.
- PRISCO, J. T. & J. W. O'LEARY. 1970b. Effect of salt and water stresses on protein synthesizing capacity of embryo-axis of germinating *Phaseolus vulgaris* L. seeds. Rev. Bras. Biol., 30: 317-321.
- PRISCO, J. T. & G. H. F. VIEIRA. 1976. Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. Physiol. Plant. 36: 317-320.
- PRISCO, J. T., J. ENEAS FILHO & E. GOMES FILHO. 1981. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp seeds. Rev. Bras. Bot. 4: 63-71.
- RICHARDS, L. A. 1954. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils. U. S. D. A. Agric. Handbook. nº 60, 160p.
- RICHARDS, E. G. & W. B. GRATZER. 1968. Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Vol. II. Eds. Ivor Smith. p438.

- SACHER, J. A., E. J. MORGAN & D. DE LAROSA. 1975. Paradoxical effect of actinomycin D. Regulation of synthesis of wound RNase at translation in turnip tissue. Plant Physiol., 56: 442-449.
- SHEORAN, I. S. & O. P. GARG. 1978. Effect of salinity on the activities of RNase, DNase and protease during germination and early seedling growth of mung bean. Physiol. Plant., 44: 171-174.
- SNEDECOR, G. W. 1956. Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. The Iowa State College Press, Ames, Iowa U.S.A. 534 p.
- SODEK, L. 1968. The effect of Kinetin on certain plant hydrolases. Tese de Doutorado, Universidade de Londres.
- STROGONOV, B. P. 1964. Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants. Traduzido do Russo por A. Poljakoff-Mayber & A. M. Mayer. Israel Program for Scientific Translations Ltd., 279 p.
- TUVE, T. W. & C. B. ANFINSEN. 1960. Preparation and properties of spinach ribonuclease. J. Biol. Chem., 235: 3437-3441.
- TVORUS, E. K. 1976. Plant ribonucleases. Soviet Plant Physiol., 23: 882-889.
- UHVITS, R. 1946. Effect of osmotic pressure on water absorption and germination of alfalfa seeds. Amer. J. Bot., 33: 278-285.

- VIEIRA, G. H. F. 1975. Efeitos da salinidade na mobilização de reservas nitrogenadas do feijão de corda seridô (*Vigna sinensis* (L.) Savi) durante a germinação. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará.
- WALTERS, T. L. & H. S. LORING. 1966. Enzymes of nucleic acid metabolism from mung bean sprouts. I. Fractionation and concentration of phosphomonoesterase, ribonucleases M_1 and M_2 , 3'-nucleotidase, and deoxyribonuclease. J. Biol. Chem., 241: 2870-2875.
- WEIMBERG, R. 1970. Enzyme levels in pea seedlings grown on highly salinized media. Plant Physiol., 46: 466-470.
- WILSON, C. M. 1963. Chromatographic separation of ribonucleases in corn. Biochim. Biophys. Acta, 68: 177-184.
- WILSON, C. M. 1967. Purification of a corn ribonuclease. J. Biol. Chem., 242: 2260-2263.
- WILSON, C. M. 1968. Plant nucleases. I. Separation and purification of two ribonucleases and one nuclease from corn. Plant Physiol., 43: 1332-1338.
- WILSON, C. M. 1969. A rapid staining technique for detection of RNase after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 31: 506-511.
- WILSON, C. M. 1971. Plant nucleases. III. Polyacrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. Plant Physiol. 48: 64-68.

- WILSON, C. M. 1975. Plant nucleases. Ann. Rev. Plant Physiol., 26: 187-208.
- WILSON, C. M. 1978. Plant nucleases. V. Survey of corn ribonuclease II isoenzymes. Plant Physiol. 61: 861-863.
- WILSON, C. M. 1982. Plant nucleases: Biochemistry and development of multiple molecular forms. Isoenzymes: Current Topics in Biological and Medical Research. Vol. 6. Alan R. Liss, New York, pp. 33-54.
- YOKOYAMA, Z., M. MIYAMOTO & K. HIRANO. 1982. Purification and properties of acid ribonuclease in rice bran. Agric. Biol. Chem., 46: 247-253.