

EFEITO DE ÁCIDO GIBERÉLICO E 6-BENZILADENINA NA UTILIZAÇÃO
DAS RESERVAS DA SEMENTE DE PHASEOLUS VULGARIS L. CV CARIOCA

Maria Terezinha Silveira Paulilo

Orientador: Gil Martins Felipe

Tese de mestrado apresentada ao Instituto de
Biologia - Departamento de Fisiologia Vegetal
Universidade Estadual de Campinas.

Í N D I C E

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
.As reservas da semente	2
.Degradação e mobilização das reservas da semente	5
. as enzimas hidrolíticas	5
. mobilização das reservas	7
.Controle e degradação das reservas	11
.Níveis hormonais endógenos	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL E MÉTODOS	19
.Material	19
.Métodos gerais	19
.Métodos analíticos	20
RESULTADOS	28
.Caracterização do material	28
.Germinação e crescimento inicial	29
.Influência do ácido giberélico e benziladenina sobre o desenvolvimento inicial da planta	35
.Influência do tratamento de ácido giberélico e benzi- ladenina sobre a atividade de amilases e proteases...	40
.Níveis endógenos de giberelinas e citocininas	57
DISCUSSÃO	61
RESUMO	84
SUMMARY	86
BIBLIOGRAFIA	88

INTRODUÇÃO

Para o estabelecimento de uma nova planta é necessário que o embrião quiescente reassuma o seu curso de desenvolvimento. Para isto uma série de reações metabólicas precisa ser iniciada, o que se dá com a hidratação dos tecidos, através da embebição da semente. Na fase inicial do crescimento o embrião é completamente dependente das reservas de semente, as quais são degradadas pelas enzimas hidrolíticas e translocadas dos órgãos de reserva para o embrião em crescimento.

O estágio inicial de germinação é acompanhado por uma diminuição em peso seco total e, somente mais tarde, quando a plântula é formada e os órgãos fotossintetizantes são expostos à luz, é que há um aumento na quantidade de matéria seca. No caso de Phaseolus (epígeo), os cotilédones se tornam verdes logo nos primeiros dias do crescimento com a protrusão do gancho plumular acima do nível do solo, contribuindo com fotossintatos para o crescimento do embrião.

As alterações nos tecidos de reserva durante o desenvolvimento da plântula, resultando na translocação de nutrientes para o embrião, são dependentes de estímulos oriundos do eixo embrionário, estímulos estes provavelmente de origem hormonal. As primeiras pesquisas sobre este assunto, feitas em cevada, mostraram que o controle exercido pelo embrião se dava através da ação de giberelinas, que atuavam no controle da atividade enzimática de amilases e proteases (Varner e Chandra, 1964). Mais recentemente houve evidências para várias outras plantas, particularmente para dicotiledôneas, de que as giberelinas não são os únicos hormônios envolvidos no controle da degradação de reservas. Assim, em leguminosas como ervilha, este controle parece se dar através da ação de citocininas (Gepstain e Ilan, 1970).

1. As Reservas de Semente

As principais reservas armazenadas em sementes são proteínas, óleos e carboidratos. A proporção de cada um destes componentes varia entre os vários grupos vegetais. Assim, em cereais como milho, trigo e cevada o material de reserva predominante é o amido, cabendo às proteínas e lipídios apenas 10% e 2% respectivamente do total de reservas da semente. Já em sementes oleaginosas como repolho, girassol e papoula, as proteínas e lípidos representam respectivamente 20% e 40%, estando os carboidratos presentes em menor proporção (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975). Em leguminosas como ervilha, feijão, soja e lentilha, entretanto, as proteínas compreendem entre 25% e 40% e, particularmente em Phaseolus vulgaris elas representam cerca de 20% a 30% das reservas da semente (Earlie e Jones, 1962).

O conteúdo protéico das sementes é composto de proteínas metabolicamente ativas, como enzimas e proteínas estruturais e de proteínas metabolicamente inativas, as quais formam as reservas protéicas e correspondem, em leguminosas, a 80% do conteúdo protéico total da semente. O primeiro grupo de proteínas encontra-se distribuído por toda a planta, mas as proteínas de reserva são específicas para sementes (Millerd, 1975; Derbyshire, Yarwood, Neat e Boulter, 1976).

As proteínas em sementes foram originalmente classificadas por Osborne (1895). Segundo suas propriedades de solubilidade diferencial quatro grupos distintos foram reconhecidos: as albuminas, solúveis em água; as globulinas, solúveis em soluções salinas; as glutelinas, solúveis em soluções de ácidos ou bases fracas e as prolaminas, solúveis em álcool. Este último grupo é específico para monocotilédôneas.

Em leguminosas, 50% a 75% das proteínas da semente são solúveis em soluções salinas, sendo portanto classificadas como globulinas (Sun e Hall, 1975). As albuminas também podem estar presentes, mas em menor proporção, raramente atingindo mais do que 10% das reservas protéicas totais.

Durante a fase de maturação na planta-mãe o crescimento dos cotilédones é caracterizado por uma fase de divisão celular, seguida por um período de expansão celular. Durante esta segunda fase, em leguminosas, 95% das proteínas são sintetizadas (Briarty, Coult e Boulter, 1969; Millerd, Simon e Stern, 1971) e Smith, 1973).

Osborne e Campbell (1896), baseados em solubilidade diferencial em soluções salinas, classificaram as globulinas de leguminosas em dois grupos: vicelina e legumina. Posteriormente, McLeester, Hall, Sun e Bliss (1973), utilizando as técnicas de ultracentrifugação e eletroforese, discutiram a validade desta classificação, uma vez que eles encontraram uma variação muito grande na composição de globulinas deste grupo de plantas. Trabalhos posteriores confirmaram que mesmo dentro de um único gênero, Phaseolus, a composição das globulinas é bastante variável, sendo que em P. coccineus e P. dumosus o componente proteico principal está na forma de uma proteína homogênea, o que já não acontece para P. lunatus onde se nota uma composição mais heterogênea no conteúdo protéico (Derbyshire, Wright e Boulter, 1976). Em adição, Hutchinson (1964) baseando-se na diversidade de globulinas em P. atropurpureus e P. latryoidea, transferiu estas espécies para o gênero Macroptilium. Entretanto a maioria dos autores concorda que as globulinas em leguminosas são formadas por duas frações principais, denominadas Glicoproteína I e Glicoproteína II, as quais em ultracentrifugação correspondem às unidades de sedimentação de 11S e 7S respectivamente. As glicoproteínas são assim chamadas por apresentarem em suas sub-unidades moléculas de açúcar, principalmente manose e glicosamina, como em Vicia faba onde legumina contém 1% de açúcares (Bailey e Boulter, 1970; Ashton, 1976). O primeiro grupo, glicoproteína I, compreende, em geral, as proteínas englobadas sob a antiga denominação de legumina e parece ser formado por uma única proteína homogênea. Glicoproteína II, que inclui o antigo grupo das vicelinas, parece ser heterogêneo, composta por várias proteínas de peso molecular diferente. Frequentemente, apenas uma destas pode predominar, sendo que em Phaseolus vulgaris a fração correspondente à glicoproteína II representa 50% do total de proteínas de reserva e 35% das proteínas totais da semente (Derbyshire et al., 1976). Este grupo parece ser composto por duas sub-unidades de peso molecular de 47 000 D e 50 000 D, na proporção de 2 ou 3:1 respectivamente (Barker, Derbyshire-Yarwood e Boulter, 1976).

Em leguminosas as frações protéicas obtidas podem deixar de apresentar alto grau de pureza devido à contaminação de várias proteínas presentes em pequenas proporções que são arras

tadas, durante a eletroforese, juntamente com as proteínas presentes em grande massa (Wright e Boulter, 1973; Millerd, 1975).

Alem das globulinas, existem ainda em Phaseolus as fito hemaglutininas, que são de interesse pela sua propriedade em aglutinar hemácias. Estas proteínas podem representar até 10% das proteínas totais da semente. Em P. vulgaris elas são compostas por várias subunidades (Leiner, 1976).

As proteínas de reserva são armazenadas em organelas subcelulares, circundadas por uma única membrana lipoprotéica, denominada corpos de proteína (Varner e Schidlovski, 1963; Bewley e Black, 1978). Inclusões frequentemente ocorrem nestes corpos e podem ser formadas por deposição de fitina, sais de potássio, cálcio ou magnésio; lipídios e RNA também podem estar presentes (Ashton, 1976).

Os corpos de proteína em Vicia faba e outras leguminosas são de um único tipo e podem conter tanto albuminas como globulinas, ou apenas uma destas proteínas em cada corpo protéico (Briarty, Coult e Boulter, 1969). Às vezes, estas organelas apresentam estruturas distintas, como em P. vulgaris onde os corpos de proteína contêm um aglomerado de filamentos (Opik, 1972). Durante a germinação estas organelas avolumam-se, seu conteúdo torna-se difuso e elas coalescem formando vacúolos (Ashton, 1976).

A distribuição de proteínas de reserva dentro dos cotilédones de feijão não é uniforme; a região abaxial é mais rica em proteínas que a região central, e mesmo a composição das subunidades das glicoproteínas é diferente nestas regiões (Barker et al., 1976).

O principal carboidrato de reserva de sementes de leguminosas é o amido. Em Vicia faba e Pisum sativum ele representa cerca de 50% do peso seco da semente e em Phaseolus pode representar até 60% (Kozlowski, 1972).

O amido é um polissacarídeo composto por dois polímeros de glicose: um linear (amilose) e outro ramificado (amilopectina). A proporção de amilose e amilopectina presente no amido é variável entre as sementes de diferentes espécies e mesmo entre variedades de uma mesma espécie. Em ervilhas, por exemplo, a variedade enrugada apresenta 66% de amilose, enquanto que na variedade lisa esta forma representa apenas 35% do amido total (Bewley e Black, 1976).

O amido é armazenado em organelas subcelulares denominadas amiloplastos, as quais podem conter um ou mais grãos de amido: a proporção de amilose e amilopectina em um grão não é definida, podendo os grãos serem mais ricos num ou noutro polímero. Os amiloplastos podem se apresentar sob várias formas dependendo do seu conteúdo em amilose; grãos mais redondos apresentam maior quantidade de amilose que de amilopectina.

2. Degradação e Mobilização das Reservas de Semente

a) As enzimas hidrolíticas

As enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas e carboidratos, as principais reservas de semente, são denominadas proteases e amilases, respectivamente. Atualmente, estas enzimas envolvidas na mobilização das reservas da semente são classificadas em exopeptidases e endopeptidases. As primeiras hidrolizam ligações peptídicas terminais, ao passo que as segundas hidrolizam ligações peptídicas internas de polipeptídeos. A maioria das sementes contém mais que uma endopeptidase, como é o caso de ervilha, onde vários tipos foram encontrados, apresentando pH ótimos diferentes para a atividade enzimática nos cotilédones de sementes em germinação. Em geral, o pH ótimo para as enzimas proteolíticas é ácido (Young e Varner, 1959; Soedigo e Gruber, 1960; Beevers, 1968). As exopeptidases podem ainda ser classificadas em carboxipeptidases e aminopeptidases, dependendo do grupo terminal da molécula protéica que eles atacam: geralmente estas duas formas de exopeptidases podem estar presentes numa mesma semente, como é o caso de cevada e abóbora (Ryan, 1973; Ashton e Dahmen, 1976a). Em ervilhas foram encontrados três tipos de exopeptidases cuja atividade não foi alterada com a aplicação de actomicina D ou cicloeximida, mostrando que as enzimas já existiam na semente seca (Ashton e Dahmen, 1967b; Mikola e Kolehmainen, 1972; Ellerman, 1974). Existe ainda em sementes as dipeptidases, enzimas proteolíticas que hidrolizam apenas pequenas moléculas peptídicas (Ashton, 1976; Ashton e Dahmen, 1967a).

O primeiro a descrever a ação enzimática de amilases foi

Kirchoff, em 1811 (in Bernfeld, 1951) quando observou que extratos de trigo tiveram a capacidade de degradar amido. Atualmente o termo amilase é usado para designar as enzimas hidrolíticas que degradam o amido.

A ação de amilases é caracterizada por uma série de mudanças nas propriedades do substrato como: aumento do poder reductor, alteração nas propriedades de coloração pelo iodo, decréscimo na viscosidade e alteração na capacidade de rotação óptica.

As amilases catalisam a hidrólise de ligações α 1-4 glicosídicas de polissacarídeos como o amido e glicogênio (carboidrato de reserva de animais) e seus produtos de degradação, as dextrinas. Esta reação em condições fisiológicas é irreversível, com o equilíbrio da reação se dando no sentido do produto formado.

As enzimas de atividade amilolítica são subdivididas em endoamilases e exoamilases; as primeiras atacam ligações α 1-4 glicosídicas, deixando inalteradas as ligações α 1-6 das ramificações de amilopectina. Os produtos primários desta ação são oligossacarídeos que mais tarde são degradados, produzindo maltose, isomaltose, glicose e pequenos polissacarídeos de cadeia ramificada. Na hidrólise completa de amilose os produtos finais obtidos são 13% de glicose e 87% de maltose; no caso de degradação da amilopectina tem-se 19% de glicose, 73% de maltose, e 8% de isomaltose.

Há um único tipo de endoamilase conhecido, a α amilase, assim denominado por produzir, através da hidrólise, açúcares redutores na forma isomérica α (Fisher e Stein, 1960). As α amilases são um grupo homogêneo e característico de proteínas, possuindo vários traços que as diferenciam de outras amilases: são ligeiramente ácidas, solúveis em água, com peso molecular ao redor de 50 000 D. Elas contêm pelo menos um átomo de cálcio na molécula, o que é essencial para a sua atividade.

O segundo tipo de amilase, as exoamilases, ocorrem exclusivamente em vegetais, podendo ser de origem microbial. Estas enzimas catalizam a hidrólise de oligossacarídeos atacando apenas o terminal não redutor da molécula, produzindo glicose ou maltose, dependendo se ataca ligações consecutivas ou alternativas. As exoamilases que produzem glicose como produto fi-

nal são chamadas de glicoamilases ou γ amilases; as que produzem maltose são chamadas de β amilases. Tanto no caso de γ amilase como no caso de β amilases, a ação enzimática pára ao encontrar a primeira ramificação, uma vez que as ligações α 1-6 glicosídicas não são hidrolizadas por estas enzimas e produzindo por esta razão dextrinas limite de alto peso molecular. Quando o substrato atacado é a amilose, o produto final formado pela hidrólise de amilase é 100% maltose. Na degradação de amilopectina por β amilase, apenas 60% da molécula é transformada em maltose, ficando os outros 40% na forma de dextrina limite (French, 1960).

b) Mobilização das Reservas

Com a germinação da semente as reservas são hidrolizadas e os produtos são translocados para o eixo embrionário em crescimento.

Em leguminosas foi demonstrado que há pelo menos oito padrões básicos de degradação nos cotilédones. Em muitas espécies de Vicia e Pisum a hidrólise tem início na região abaxial do cotilédone, sem envolvimento das regiões ao redor dos feixes vasculares. Este não é o caso de Vicia faba, onde as regiões dos feixes vasculares também sofrem hidrólise. Mesmo dentro de um único gênero, como Phaseolus, o padrão de hidrólise pode variar muito, começando inicialmente na região abaxial do cotilédone (P. coccineus, P. angularis e P. calcaratus), ou na região adaxial (P. aureus e P. mungo), ou ainda no tecido central (P. vulgaris e P. lunatus). Em todos estes casos a hidrólise da região imediatamente ao redor dos feixes vasculares tem início posterior ao da região abaxial, central ao abaxial do cotilédone (Smith, 1972, in Bewley e Black, 1978). Também em amendoim foi detectada atividade proteolítica em todo o cotilédone, com exceção das regiões ao redor dos feixes vasculares e das regiões fotossintetizantes próximas à epiderme (Bagley, Cherry, Rollins e Altschul, 1963; Yomo e Varner, 1973).

Considerando apenas a translocação das reservas principais, amido e proteína, foi verificado que estes dois componentes nem sempre seguem o mesmo padrão de mobilização. Em Pisum

sativum e Vigna sesquipedalis o início da hidrólise destas reservas ocorre ao mesmo tempo, mas já em Vicia faba a degradação do amido tem início posterior ao de proteína, enquanto em Phaseolus vulgaris os corpos de proteína começam a ser hidrolizados antes que os grãos de amido (Bewley e Black, 1978).

As proteínas de armazenamento para passarem a peptídeos solúveis capazes de sofrer a ação de exopeptidases são, em geral, previamente hidrolizadas pelas endopeptidases presentes tanto em sementes secas como em sementes germinadas. O padrão de atividade das endopeptidases varia muito de espécie para espécie: em trigo há um aumento contínuo da atividade destas enzimas após o segundo dia de germinação; em ervilha e amendoim a atividade permanece constante durante a germinação; em alface há dois picos de atividade para estas enzimas durante a germinação da semente (Penner e Ashton, 1967a; Yomo e Varner, 1973; Harvey e Oaks, 1974). Também em Phaseolus vulgaris a atividade proteolítica aumenta com o decorrer da germinação, não sendo este aumento resultado da nova síntese de enzimas (Yomo e Srinvasen, 1973).

Basha e Beevers (1975), estudando ervilhas, encontraram que a taxa de degradação das reservas protéicas era maior entre o 2º e 8º dias de germinação, coincidindo com o período em que a atividade proteolítica tinha seu pico máximo. Curiosamente num trabalho anterior com ervilhas, Beevers (1968), apesar de também ter encontrado maior taxa de degradação entre o 2º e 8º dias de crescimento, observou que o pico de atividade proteolítica se dava ao redor do 11º dia. Isto, talvez, possa ter sido reflexo da análise da atividade enzimática "in vitro", onde as condições experimentais são ótimas e inibidores naturais de proteólise são removidos. Inibidores proteolíticos foram encontrados em arroz, cevada e em feijão, sendo identificados como inibidores de tripsina (Burger e Sielgelman, 1966; Ashton, 1976; Bewley e Black, 1978). Beevers sugeriu que os dois sistemas proteolíticos encontrados em ervilha correspondiam às proteases específicas para leguminas e vicelinas.

Parece que em ervilha as globulinas de reserva, que compreendem as principais reservas protéicas, sofrem alteração em sua composição antes de serem translocadas. Estas alterações não envolvem desaminações ou descarboxilações, que são características da mobilização destas glicoproteínas em amendoim e so-

ja, onde o primeiro traço da utilização de proteínas é o fornecimento de amônia ao embrião através de ação de desaminases (Catsimpoolas, Campbell e Mayer, 1968; Deussant, Neucere e Conkerton, 1969). A remoção dos açúcares destas glicoproteínas ocorre assim que a clivagem das ligações peptídicas tem início, liberando oligossacarídeos que podem posteriormente sofrer a ação de amilases (Basha e Beevers, 1975). As enzimas proteolíticas podem estar associadas a corpos de proteína, podem estar solúveis no citoplasma, ou ainda ligadas às membranas celulares. Em algodão, ervilha, cevada e girassol a atividade de endopeptidases foi detectada apenas em corpos de proteína; já em Vicia crespa, além da atividade nos corpos de proteína, também foram detectadas outras proteases no citoplasma e em Phaseolus vulgaris, entretanto, as enzimas parecem estar presentes apenas no citoplasma (Yatsu e Jacks, 1968; Ory e Hennigsen, 1969; Schnarrenberger, Oeser e Tolbert, 1972). Foi sugerido que nestes casos as enzimas proteolíticas seriam sintetizadas no retículo endoplasmático e transportadas em vesículas para os corpos de proteína, onde seriam incorporadas (Bewley e Black, 1978).

Em Phaseolus aureus foi verificado que os corpos de proteína além de conterem peptidases, também continham enzimas responsáveis pela hidrólise de manose e glicosamina presentes nas glicoproteínas. Apesar destas enzimas já se encontrarem na semente seca, elas são ativadas somente após o 2º dia de germinação (Chrispeels, Baumgartner e Harris, 1976).

A degradação de proteínas de reserva, feita pelas enzimas proteolíticas, libera aminoácidos que podem ser utilizados "in situ" na síntese de novas enzimas no próprio cotilédone. Vários autores verificaram a atividade metabólica dos cotilédones onde altas porcentagens de adenina e leucina marcadas foram incorporadas em ácido ribonucleico e proteínas durante o período de hidrólise das reservas (Young e Varner, 1959; Larson e Beevers, 1965; Beevers e Splittstoesser, 1968). Entretanto, a maioria dos aminoácidos é translocada e utilizada na síntese de várias enzimas e proteínas estruturais no tecido embrionário. No entanto, alguns aminoácidos podem sofrer transaminações, convertendo-se em outros aminoácidos; aí podem sofrer desaminações e serem utilizados na síntese de compostos não nitrogenados; ou podem ainda ser completamente metabolizados para produção de

energia (Guardiola e Sutcliffe, 1971). Em ervilha, as mudanças mais marcantes na degradação de reservas protéicas estão associadas a apenas três aminoácidos: ácido glutâmico/glutamina, ácido aspártico/esparagina (componentes mais abundantes de glicoproteína I e glicoproteína II) e homosserina, um aminoácido não protéico. Através de estudos com glutamato e aspartato marcados, fornecidos aos cotilédones durante a germinação, verificou-se que uma grande proporção do carbono marcado era recuperado na forma de gás carbônico respirado, sendo 56% proveniente do glutamato e 48% do aspartato. O carbono marcado não foi encontrado nem em açúcares, nem em lípidos, mas sim em homosserina, indicando a conversão do aspartato e glutamato para este aminoácido: este processo ocorre ainda no tecido cotiledonar e então a homosserina é transportada para o eixo embrionário. O observado para ervilha difere do observado para cereais e mamona, onde o glutamato e aspartato são a forma principal de transporte de hidrogênio para o embrião. É interessante notar que em leguminosas, os próprios cotilédones (epígeos) são capazes de sintetizar aminoácidos por aminação de esqueletos de carbono produzidos pela fotossíntese (Larson e Beevers, 1965).

A hidrólise do amido pode se dar através da ação de amilases e fosforilases, embora em tecidos de reserva, como sementes, a ação principal é de α amilase (Swain e Dekker, 1966).

Juliano e Varner (1969) verificaram que, nos primeiros seis dias de germinação de ervilha a degradação do amido foi lenta, coincidindo com baixo nível de α amilase; β amilase estava presente num nível constante e fosforilase apresentava um pico de atividade no 5º dia de germinação, embora até esta data o total de amido utilizado tenha sido pequeno. No 6º dia de germinação a hidrólise rápida do amido teve início coincidindo com uma rápida síntese de α amilase. Por estes motivos estes autores concluíram que a degradação do amido se deve principalmente à α amilase, e as duas outras enzimas, embora já presentes na semente madura têm papel secundário. Em ervilha, uma segunda β amilase presente em forma latente na semente seca, é liberada durante a germinação. Também em trigo há a liberação de uma amilase durante a germinação, que na semente madura está conjugada à glutelina. "in vitro" estas enzimas podem ser liberadas por tratamento com mercaptoetanol (Roswell e Goad, 1962).

Parece, então, que em tecidos de reserva a α amilase é a enzima hidrolítica responsável pela maior degradação tanto de amilosa como de amilopectina: a participação de fosforilases e β amilase é inicialmente menor, já que estas enzimas só, podem hidrolizar ligações terminais, liberando os açúcares livres um a um (Greenwood e Thomson, 1962; Liddle, Manners e Wright, 1969).

3. Controle de Degradação das Reservas

A maioria dos trabalhos sobre o controle hormonal das enzimas responsáveis pela hidrólise das reservas foi feita utilizando cereais, particularmente cevada. Isto se deve em primeiro lugar a sua importância no processo de maltagem e por ser um material que se presta mais facilmente a este estudo: as enzimas hidrolíticas são sintetizadas nas células da camada de aleurona, além de que o embrião pode ser removido sem danos. Este já não é o caso de muitas dicotiledôneas onde todas as células do cotilédone são local de síntese de enzimas hidrolíticas e o embrião é dificilmente removido sem ser danificado.

Em cevada, portanto o controle da degradação das reservas é bem conhecido, onde as giberelinas produzidas no embrião e escutelo estimulam a síntese ou liberação de enzimas na camada de aleurona, as quais vão ao endosperma e hidrolizam as reservas. Entretanto, em outros cereais como o trigo, parece haver uma ação conjunta entre giberelinas e citocininas no controle da degradação das reservas do grão (Eastwood, Tavener, e Laidman, 1969). Parece que aí também há a influência do ácido indolacético no metabolismo de triglicerídeos.

Em outras plantas muito pouco é conhecido sobre o controle da degradação de reservas.

Muitas das enzimas envolvidas na hidrólise de reservas em dicotiledôneas parecem ser sintetizadas "de novo", embora não haja provas concretas deste fato. Assim a atividade enzimática em muitas sementes é prevenida por inibidores de síntese de proteínas ou de Ácido Ribonucleico como é o caso de dipeptidase e isocitrato liase em Cucurbita maxima (Penner e Ashton, 1967, Sze e Ashton, 1971); enquanto actomicina D previne o aumento destas enzimas em mamona (Lado, Schwendimen e Marrê, 1968). Também síntese "de novo" de isocitrato em Citrullus vul

garis (Hock, 1969) e endopeptidase em feijão mungo (Chrispeels et al, 1976) foi demonstrada através de experimentos com marcação de átomos pesados.

Em outras plantas, entretanto, parece em algumas destas enzimas hidrolíticas já estão presentes na semente seca, como é o caso de isocitrato liase em Cucurbita pepo e Cucumis sativus (Presley e Fowden, 1965), ou no caso de lipase em mamona (Muto e Beevers 1974).

A maior parte dos estudos atualmente feitos sobre o controle de mobilização das reservas em sementes, que não de cereais, segue dois tipos: o estudo do efeito do embrião sobre a hidrólise das reservas, ou a análise de efeito de reguladores de crescimento sobre este processo.

Em ervilha, a influência do embrião na mobilização de reservas é discutível. Varner, Balce e Huang (1963) verificaram que a respiração e a diferenciação de mitocôndrias e outras mudanças subcelulares foram prejudicadas em cotilédones na ausência do embrião. Os cotilédones parecem, portanto, requerer um fator do embrião para o desenvolvimento e manutenção do metabolismo respiratório; este fator pode ser suprido mesmo por um pequeno pedaço do embrião (Young, Huang, Vanecko, Marks e Varner, 1960). No entanto a influência do embrião na mobilização de amido e proteína em ervilha é ainda incerta. Em alguns casos a hidrólise do amido como de proteína ocorreu tanto em cotilédones destacados como naqueles presos ao embrião (Bain e Mercer, 1966). Há outros estudos, entretanto onde a atividade proteolítica foi inibida em cotilédones destacados (Guardiola e Sutcliffe, 1971; Chim, Poulson e Beevers, 1973; Yomo e Taylor, 1973).

As consequências da excisão dos cotilédones sobre a atividade da α amilase em ervilha incluem inibição (Varner, Balce e Huang, 1966; Locker e Ilan, 1975); promoção (Yomo e Varner, 1973) ou nenhum efeito (Bain e Mercer, 1966).

Em plantas apíceas, como Phaseolus vulgaris, cotilédones destacados mostraram atividade amilolítica mais baixa que naqueles presos ao embrião, entretanto este efeito só foi manifestado 96 horas após a excisão dos cotilédones (Dale, 1969). Certamente nestes casos há uma interação entre a presença da luz, a formação de clorofila e a atividade da amilase (Van Onckelen, Caubergs e de Greef, 1977. A remoção do embrião

em Cucurbita máxima causou uma diminuição na atividade de enzimas proteolíticas (Penner e Ashton, 1967); Wiley e Ashton, 1967; Sze e Ashton, 1971), e em algodão e Helianthus annuus inibiu a mobilização dos lipídios (Gilad, Ilan e Reinhold, 1970). Em contraste, a remoção do embrião não teve efeito sobre a atividade de isocitrato liase em amendoim e nem sobre a degradação de lipídeos em mamona (Marcus e Feely 1964; Marriot e Northcote, 1975)

Em mamona, tanto na ausência como na presença do embrião, um grande número de enzimas envolvidas na mobilização dos lípidos (acil coenzima A desidrogenase, isocitrato liase e frutose 1-6 difosfatase aparece no citoplasma, embora haja maior atividade destas enzimas na presença de embrião (Huang e Beevers 1974).

Os mecanismos pelos quais o embrião poderia exercer controle sobre a atividade enzimática seria através de controle hormonal ou funcionando como fonte de consumo.

Em Cucurbita maxima, Wiley e Ashton (1967) mostraram que havia um fator difusível no embrião necessário para a hidrólise de proteínas, em mamona, Scala, Patrick e Macbeth (1969) notaram que extratos de embrião aumentavam a atividade de frutose 1-6 difosfatase. A inferência destes resultados era que o embrião produziria um fator hormonal que promovia certos passos do metabolismo dos cotilédones.

Se um hormônio vegetal é capaz de substituir, experimentalmente, a presença do embrião na degradação das reservas, é razoável assumir que este hormônio, endogenamente, possa estar envolvido no controle da degradação de reservas. Estudos com aplicação exógena de giberelinas mostraram que em Cucurbita maxima este hormônio não exerce influência, mas já em mamona, durante a degradação das reservas, houve um aumento de atividade da frutose 1-6 difosfatase (Marriot e Northcote, 1975) e em algodão houve um aumento de atividade de lipases nos cotilédones (Bewley e Black, 1978)

A situação para ervilha, uma das dicotiledôneas mais estudadas a este respeito, é confusa havendo trabalhos mostrando aumento da atividade de α amilase em resposta ao tratamento giberelinas (Varner, Balce e Huang, 1963; Locker e Ilan (1975); como também trabalhos onde a aplicação de giberelina exógena em cotilédones desta espécie não mostrou influência na mobiliza-

ção das reservas, o mesmo acontecendo com cotilédones de Phaseolus vulgaris (Sprent, 1968; Gepstain e Ilan, 1970; Yomo e Varner, 1973).

Mesmo onde a influência de tratamento com giberelina foi demonstrada, este efeito é sempre muito menor que aquele provocado pela aplicação deste hormônio em cereais, onde a atividade amilolítica pode aumentar até cem vezes sob este tratamento.

Outro grupo de hormônios vegetais envolvido na degradação de reservas são as citocininas. Em cotilédones destacados de Cucurbita maxima, tratados com 6-benziladenina, houve promoção da atividade de proteases, dipeptidases e isocitratato liase, além de que o tratamento com este hormônio pode substituir perfeitamente a presença do embrião (Penner e Ashton, 1967 a,b; Sze e Ashton, 1971). Em ervilha mais uma vez, os resultados foram conflitantes, sendo que os efeitos deste tratamento hormonal variaram desde inibição (Sprent, 1968 b), à pequena estimulação (Varner, Balce e Huang, 1963) e alcançando a completa substituição da presença do embrião quando utilizada uma combinação de ribosídeo de zeatina com giberelina (Locker e Ilan, 1975). Citocininas ainda aumentam a atividade de α amilase em cotilédones de Phaseolus vulgaris e promovem a liberação de açúcares livres em Helianthus annuus (Gilad et al, 1970). Entretanto, estes efeitos apresentados pela aplicação de citocinina exógena são pequenos, sendo que os tecidos não tratados já apresentam alguma atividade enzimática.

Há ainda trabalhos mostrando a implicação do ácido abscísico no controle da degradação das reservas, inibindo a atividade da α amilase como é o caso de ervilha, onde este hormônio ocorre ao nível de 7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso fresco da semente germinada (Chrispeels, Varner 1966; Yomo e Varner, 1973).

O outro caminho pelo qual o embrião poderia regular a degradação das reservas cotiledonares seria a sua própria atuação como fonte de consumo. Isto implica que o tecido de reserva deve ser auto suficiente, tendo a capacidade de sintetizar todas as enzimas requisitadas para a degradação das reservas, sem necessitar de nenhum fator proveniente do embrião. O embrião exerceria controle simplesmente por incorporar os produtos de hidrólise do tecido de reserva, mantendo as concentrações abaixo de um nível crítico. Evidências para esta hipótese foi encontrada

em trabalhos de Yomo e Varner (1973) com ervilha, onde foi mostrado que a atividade proteolítica da semente foi diminuída quando as plantas receberam fornecimento de aminoácidos exógenos. Em cereais este fato também foi mostrado em trabalhos de Oaks (1965) com milho.

4. Níveis hormonais endógenos

As giberelinas e citocininas, que parecem ser os hormônios envolvidos na degradação de reservas durante a germinação, já estão presentes em altas quantidades em sementes em desenvolvimento na planta mãe, controlando sua formação. A presença destes hormônios em sementes secas tem sido estudada: no caso de giberelinas há vários trabalhos citando níveis quantitativos e qualitativos deste hormônio em várias sementes; entretanto para citocininas há menos informações não se tendo conhecimento preciso sobre o nível endógeno deste hormônio em sementes secas.

Embora sementes em desenvolvimento sejam fontes muito ricas em citocininas, a atividade fisiológica destes hormônios diminui drasticamente na semente madura, dificultando sua extração e detecção nestes tecidos. Apesar destas dificuldades, Koshimizu, Kuzaki, Mitsui e Matsubara (1967), trabalhando com sementes maduras de Lupinus luteus isolaram dihidrozeatina; Gupta e Maheswari (1970) detectaram citocininas em sementes maduras de melancia e abóbora: no caso de abóbora os três hormônios com atividade citocinínica encontrados não corresponderam à nenhuma citocinina conhecida; Webb Van Standen e Wareing (1973) detectaram citocinina em sementes dormentes de alface. No caso de alface havia altos níveis de citocininas solúveis em água e menores níveis solúveis em butanol. Grande parte das citocininas estavam conjugadas, mostrando uma atividade menor ou mesmo inatividade quando comparadas com o hormônio na forma livre. Embora a forma conjugada normal para citocininas seja a de ribosídeo ou ribotídeo, há evidências de que elas também podem estar conjugadas à glicose. Parker e Letham (1973) trabalhando com semente de rabanete identificaram um metabólito de citocinina bastante ativo, um glicosídeo de rafanatina (7-glicosil-zeatina), que segundo estes autores poderia ser uma forma de armazenamento deste hormônio.

As giberelinas também ocorrem em sementes secas tanto na

forma livre, como na conjugada. Radley (1958) encontrou em sementes secas de ervilha e feijão cerca de 1-3 μg equivalentes a GA_3/Kg de semente. Um estudo sobre sementes maduras de 18 espécies distintas mostrou a presença de giberelinas em quase todas as espécies, variando a quantidade entre 2 e 100 μg eq. a GA_3/Kg de semente: arroz, trigo e milho mostraram níveis entre 5 e 15, μg eq. e GA_3/Kg de semente; enquanto que algumas sementes da família das Convolvulaceas, como Ipomoea batatas atingiu até 900 μg . eq. a GA_3/Kg de semente (Brian, 1966).

As sementes, em geral, contêm mais de um tipo de giberelinas: em maçã, as sementes imaturas contêm GA_3 ; GA_4 ; GA_7 (Weaver 1972); em Echynocystis macrocarpa eles contêm GA_1 ; GA_3 ; GA_4 e GA_7 e em algodão, GA_1 ; GA_2 ; GA_3 ; GA_4 ; GA_7 ; GA_9 ; GA_{13} (Shindy e Smith, 1976). Sementes em desenvolvimento de Phaseolus vulgaris contêm GA_1 ; GA_5 ; GA_6 e GA_8 nas proporções de 5: 0,7 : 8: 16 μg . eq. e GA_3/Kg de semente (Brian, 1966).

O nível de giberelinas livres em sementes imaturas é muito maior que em sementes maduras. Assim, em feijão as sementes em desenvolvimento apresentam níveis de 250 μg eq. a GA_3/Kg de semente enquanto que nas secas este nível diminui para apenas 1-3 μg eq. a GA_3/Kg de semente. Esta queda drástica no nível de giberelinas levou à hipótese de que durante a maturação as giberelinas passariam para uma forma conjugada, não ativa, e portanto não sendo detectáveis em bioensaios. Foi também sugerido que as giberelinas passariam de formas ativas para formas não ativas por exemplo GA_8 , com o decorrer da maturação da semente. Este fato foi demonstrado em Phaseolus multiflorus onde as sementes imaturas continham altos níveis de GA_1 , uma giberelina muito ativa, e as sementes secas ao contrário apresentavam altos níveis de GA_8 , uma forma inativa em bioensaios (Durley, MacMillan e Pryce, 1971). Em ervilha, da mesma maneira, a semente imatura teve ao início altos níveis de GA_9 forma bem ativa sendo que em períodos mais avançados de maturação a forma mais abundante passou a ser de GA_{29} , pouco ativa, tendo antes a forma primitiva passado para GA_{17} e GA_{20} subsequentemente (Jones e Stoddart, 1977). Recentemente em Phaseolus também foram encontradas várias giberelinas tanto na forma livre como conjugada, sendo que a proporção relativa destes hormônios mudou durante a maturação da semente

(Suge e Gallardo, 1977). No caso particular de sementes de Phaseolus vulgaris em maturação, as giberelinas vão gradativamente se transformando em glicosídeos de GA₈, a forma de giberelina mais abundante na semente seca (Khrishnamorthy, 1975). As mesmas mudanças foram recentemente mostradas em sementes de ervilha em desenvolvimento por Durley, Sassa e Pharis (1979).

Em sementes maduras de feijão também foram encontradas ésteres glicosídicos de GA₁; GA₃; GA₄; GA₃₇ e GA₃₈; estes compostos são altamente solúveis em água e podem ser hidrolizados por esterases, liberando o hormônio da forma livre (Khrishnamoorthy 1975). Formas glicosídicas de GA₂₀; GA₂₉ e GA₃₁ também foram detectadas em sementes maduras de Pisum sativum, que podem ser hidrolizadas por glicosidases, enzima também presente na semente madura.

Além das ligações de giberelinas com açúcares, também há autores que sugerem que este hormônio possa estar ligado a compostos nitrogenados como aminoácidos ou proteínas (Jones, 1964; Pegg, 1966). Estas formas conjugadas ainda não foram isoladas embora McComb (1961), depois de tratar sementes secas de Phaseolus multiflorus, com ficina, uma enzima proteolítica presente no látex de Ficus, detectou níveis mais altos de giberelina livre. Mais recentemente foram encontradas giberelinas ligadas a proteínas específicas que parecem estar envolvidas em respostas de crescimento. (Stoddart, Breidenbach, Nedeau e Rappaport, 1974).

Finalmente, é interessante notar que a distribuição deste hormônio dentro dos cotilédones de leguminosas é desigual, sendo que cotilédones de Phaseolus vulgaris apresentaram maior quantidade de giberelina na parte distal que na parte proximal. Este fato, segundo Gotoh e Esashi (1973;) é devido à translocação de giberelina, acumulada durante a maturação da semente, da parte proximal de cotilédone para o embrião.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o estudo do desenvolvimento inicial da planta de feijão e a utilização das reservas cotiledonares durante este período, tanto em condições normais como sob

tratamento com os reguladores de crescimento, ácido giberélico e 6-benziladenina, uma vez que o papel destas substâncias no controle da utilização das reservas em sementes de algumas leguminosas é ainda incerto. Para isto, foi analisado o crescimento de plantas tratadas e não tratadas, tanto em termos de morfologia externa, como também em relação à utilização das reservas cotiledonares durante o crescimento. O efeito do embrião (geralmente aceito como o sítio de síntese destes hormônios) na degradação das reservas cotiledonares também foi examinado, já que a sua influência no controle de mobilização das reservas é ainda discutível.

Isto foi feito através de estudos sobre a atividade de amilases e proteases em cotilédones normais e destacados, uma vez que amido e proteínas são as principais reservas das sementes. Finalmente procurou-se estabelecer uma relação entre os parâmetros vistos e os níveis endógenos destes hormônios para melhor interpretação dos resultados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizados sementes e plantas de Phaseolus vulgaris cv carioca. As sementes foram gentilmente cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas.

Métodos Gerais :

Condições de Crescimento

As condições de crescimento e cultura de plantas de feijão foram variáveis, dependendo dos experimentos.

Para os experimentos de análise de crescimento, sementes de uma determinada faixa de peso foram plantados em potes plásticos, de 9,5 cm de diâmetro (volume de 500 ml.), ou em bandejas plásticas com vermiculite e areia na proporção de 1:1. As sementes foram postas para germinar em casas de vegetação. Quando foi requerido tratamento hormonal, as sementes foram previamente colocadas em placas de Petri com papel de filtro umidecido na solução do hormônio em questão e deixadas por um mínimo de 12 horas, à temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em câmaras de crescimento FORMA, quando então foram transferidas para as condições de crescimento requeridas em cada experimento.

Experimentos de extração e dosagem de hormônios utilizaram sementes embebidas em rolos de papel de filtro umidecidos em água destilada, colocados em câmaras de crescimento à temperatura de 25°C .

Em experimentos de medidas de respiração, as sementes foram embebidas em placas de Petri com papel de filtro umidecido em água destilada, ou em soluções dos hormônios requeridos, por um mínimo de 12 horas a 25°C .

Em experimentos de medidas de atividade enzimática as sementes foram separadas ainda secas, em duas metades longitudinais, uma contendo o embrião e outra isolada deste.

Os cotilédones com e sem embrião foram colocados em placas de Petri com papel de filtro umidecido em água destilada, ou solução de ácido giberélico (GA_3 da EASTMAN), ou solução de 6-benziladenina (6-BA de SIGMA CHEMICAL CO.), ambos em concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , $10^{-7}M$ e também $1,5 \times 10^{-4}M$ de GA_3 e a $2 \times 10^{-4}M$ de 6-BA. Os cotilédones foram deixados em câmaras de crescimento e temperatura de $25^\circ C$. Após 24 horas de embebição nas substâncias reguladoras de crescimento, os cotilédones foram transferidos para placas de Petri com papel de filtro umidecido apenas em água destilada. Em alguns experimentos os cotilédones foram mantidos no escuro até serem utilizados.

Métodos analíticos

- a. peso fresco - O peso de raiz, caule, folhas e cotilédones foi obtido utilizando-se balança de torção DLM 2 (The Torsion Balance Co.), com sensibilidade, de 0,01g. O peso de sementes maduras foi obtido em balança analítica SARTORIUS, com sensibilidade de 0,1 mg.
 - b. peso seco - O peso seco de raiz, caule, folhas e cotilédones foi obtido utilizando-se balança analítica SARTORIUS, após secagem do material, por 48 horas, em estufa a $80^\circ C$.
 - c. área foliar - a área foliar foi obtida através de desenho das folhas em papel, o qual foi recortado, pesado e este peso comparado ao peso de um papel padrão, com área conhecida.
 - d. altura de planta - as medidas de comprimento foram tomadas do nível do solo até o ápice da planta.
 - e. espessura do caule - a espessura do caule foi obtida utilizando-se espessímetro Mitutoyo (Mitutoyo Lta.).
 - f. medidas de respiração - as medidas de respiração foram feitas através de respirômetro de Warburg, a $30^\circ C$ (Umbreit e Burris 1964).
- Em frascos de Warburg foram colocados 1 ml de água destilada para embebição de sementes intactas, ou 1 ml de solução de

sacarose a 0,005M, para a embebição de embriões isolados. No poço central do frasco foi colocado 0,5ml de solução de KOH a 20% e uma tira de papel de filtro para aumentar a superfície de absorção ao gás carbônico, liberado durante a experimentação, o qual é absorvido pela solução hidróxido de potássio. Os frascos, ajustados nos seus respectivos manômetros, foram então colocados no respirômetro, em banho-maria, a 30°C, ficando abertos durante os primeiros 30 minutos, até que houvesse o estabelecimento do equilíbrio térmico. Depois deste tempo os manômetros foram fechados, registrando-se as medidas de respiração a intervalos de tempo conhecidos.

Termobarômetros foram empregados para registrar pequenas variações de pressão do ambiente.

g. dosagem de clorofila - a clorofila foi dosada segundo o método de Arnon (1949). O tecido foi macerado em almofariz, com acetona pura, a frio. O extrato obtido foi filtrado, completando-se o volume para 25 ml com água destilada, até ter-se uma solução de acetona a 80%. A absorbância desta solução foi lida a 645,652 e 663 nm em espectrofotômetro TECNOLAB ou VARIAN.

h. dosagem de proteína solúvel. As proteínas foram dosadas segundo método de Lowry, Rosebrough, Farr e Randall (1951). Proteínas de raiz, caule, folhas e cotilédones foram extraídas em almofariz, em volume conhecido de NaOH 0,1M. O extrato foi centrifugado por 10 minutos, a 2500 g, em centrifugador FANEM Lta. Do sobrenadante obtido foram retiradas alíquotas, de volume conhecido, que foram colocadas em tubos de centrifugação, juntamente com ácido tricloroacético (TCA da ECIBRA) a 10% e mantidos a 4°C até precipitação das proteínas. Após centrifugação o precipitado obtido foi ressuscitado em volume conhecido de NaOH 0,1M. Ao mesmo tempo foi feito um padrão de proteína, utilizando albumina de soro bovino (BSA de SIGMA CHEMICAL Co., 99% de albumina), em concentração de 0,0 a 200,0 ug. Às amostras e ao padrão de BSA, ambos em 1ml de solução de NaOH 0,1M, foram adicionados 5 ml de solução alcalina de cobre e tartarato, contendo 3g de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ em 95,5 ml de NaOH 0,1M; 1 ml de sulfato de cobre a 10% e água destilada; 2 ml de tartarato de potássio e sódio a 10% em NaOH 0,1M. Após o tempo de 15 minutos foi adicionado reagente de Folin a 50% em água destilada (reativo de Folin CIOCALTEAU, QUEBEC).

INDÚSTRIAS QUÍMICAS S.A.), sendo os tubos agitados imediatamente. Após a estabilização de cor azul leu-se a absorbância da solução a 620 nm. Através de uma curva padrão de BSA calculou-se a quantidade de proteína solúvel encontrada no extrato.

i. dosagem de amilases - a dosagem da atividade de amilases foi feita medindo-se o aparecimento de maltose com o tempo, utilizando-se ácido 3,5 dinitrossalicílico, segundo o método de Bernfeld (1955). Cotilédones destacados ou presos ao embrião, em bebidos em água ou solução de ácido giberélico ou 6-benziladenina, depois de obtidas as medidas de peso fresco e separação dos embriões (colocados em estufa a 80°C para medidas de peso seco), foram macerados em solução tampão de fosfato de potássio a 0,02M de pH 5,5 (5ml de tampão/ cotilédone). O extrato obtido foi centrifugado por 5 minutos, a 2500 g, a 0,5 ml do sobrenadante foram incubados em tubos de ensaio, contendo 1ml de amido (9,0g de ARROZINA - fécula de mandioca e amido de milho da IDISA, em 100 ml de tampão fosfato de potássio de pH 5,5), à temperatura de 30°C, em banho-maria. A reação foi terminada com 2 ml de solução de ácido 3,5 dinitrossalicílico (1g de ácido 3,5 dinitrossalicílico em 20 ml de NaOH 2M; 30g de tartarato de potássio e sódio em 50 ml de água destilada. O volume final foi completado para 100 ml com água destilada). Após o término da reação, os tubos de ensaio foram aquecidos à temperatura de 100°C, em banho-maria, por 10 minutos. A absorbância da solução, depois de diluída em água destilada (0,4 ml de solução em 9,6 ml de água) foi lida a 535 nm, e os valores comparados com os de uma curva padrão de maltose em concentração de 0,0 a 200 ug.

Para a dosagem apenas de β amilase, os extratos foram esquentados por 15 minutos a 70°C, segundo método de Dure (1960) e Van Onckelen, Caubergs e De Greef (1977), repetindo-se o método utilizado para α e β amilases.

j. dosagem de proteases - a atividade proteolítica foi medida através da produção de tirosina e triptofano com o tempo utilizando-se reagente de Folin, segundo método de Lowry et al (1951) e de Prisco, Ainouz e Mello (1975). Do mesmo extrato utilizado para dosagem de atividade amilolítica foram retirados 0,3 ou 0,5 ml e incubados em tubos de ensaio com 1 ml de caseína (1g de caseína em 100 ml de NaOH 1M, ajustando-se depois o pH para 5,5 com tampão fosfato monobásico) à temperatura de 40°C, por 3 ou

4 horas, em estufa FANEM. A reação foi terminada com 2 ml de ácido tricloroacético a 10%. Brancos também foram feitos, parando se a reação imediatamente, medindo-se desta forma a quantidade de aminoácidos livres no próprio extrato. Após o término da reação os tubos foram colocados em centrífuga, por 10 minutos, a 2500 g. De sobrenadante obtido foi retirado 1 ml, que foi adicionado a 1 ml de NaOH 1M. A esta solução foi adicionada 0,1 ml de reagente de Folin puro, agitando-se a solução imediatamente. A absorbância da solução foi lida a 620 nm.

1. dosagem de aminoácidos livres - o método utilizado para a sosagem de aminoácidos livres foi o de Smith e Agiza (1951).

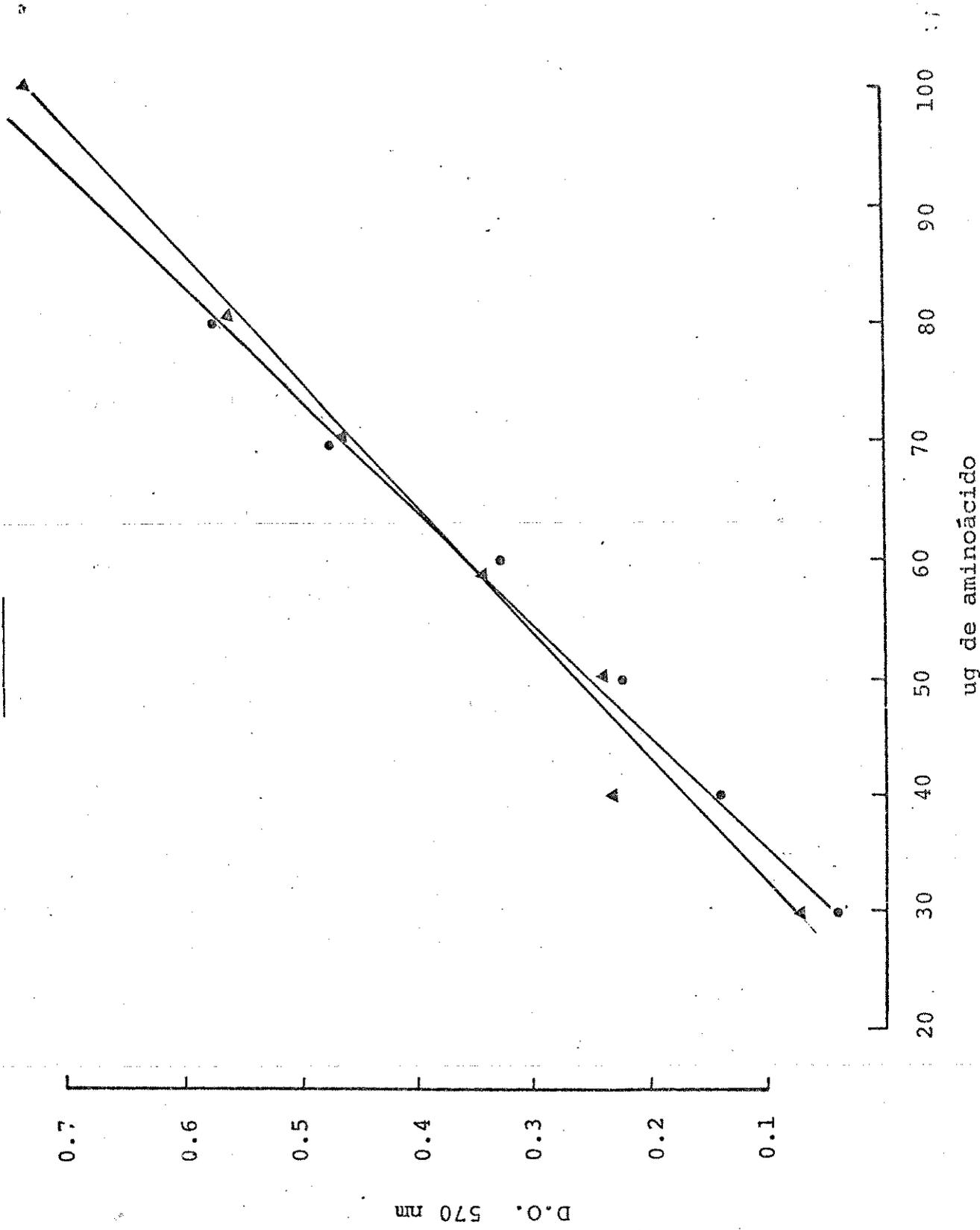
Do extrato de plantas, maceradas em tampão fosfato de potássio com pH 5,5, foi retirada uma alíquota de 0,5 ml, que foi adicionada a 0,5 ml de NaOH 0,1M, a 0,5 ml de cloreto de estanho (0,5 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em tampão citrato) e 0,5ml de ninhidrina (550 mg de ninhidrina de SIGMA CHEMICAL Co.nº 4876) em tampão citrato. Para preparação do tampão citrato utilizaram-se 21,008 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 200 ml de água e 275 ml de NaOH 1 N e 15 ml de butanol para evitar o crescimento de fungos.

Estes tubos, tampados, foram colocados em banho-maria a 100°C, por 10 minutos, até o aparecimento da cor azul. As soluções foram diluídas em água destilada e sua absorbância lida a 570 nm em espectrofotômetro VARIAN. A cor produzida foi comparada com um padrão de aminoácido puro. Smith e Agiza (1951) testaram curvas para vários aminoácidos, determinando curvas distintas para cada aminoácido, embora próximas entre si. Assim foram escolhidos dois aminoácidos, leucina e ácido aspártico, que segundo estes autores foram os aminoácidos que deram respectivamente maior e menor intensidade na cor produzida. A figura 1 mostra as curvas-padrão destes dois aminoácidos, observando-se que os valores de absorbância obtidos foram próximos para os dois casos

m. dosagem de açúcares livres - a extração de açúcares livres foi feita segundo método de Bielski e Turner (1966). O tecido vegetal, 20 mg, foi macerado em 4 ml de uma solução de metanol, clorofórmio e água, na proporção de 12: 5: 3. O macerado foi colocado em tubos de centrífuga, adicionando-se 1 ml de clorofórmio e 1,5 ml de água, procedendo-se a seguir à centrifugação a

FIGURA 1. Curvas-padrão para várias concentrações de ácido aspártico (▲) e leucina (●) feitas através da reação com ninhidrina e lidas a 570 nm.

FIGURA 1



2500 g. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 1 ml que foi diluída em 3 ml de água destilada. Desta solução retiraram-se 0,5 ml que foram adicionados a 1 ml de antrona (0,2% de antrona da SIGMA CHEMICAL Co. em ácido sulfúrico) para a determinação de açúcar livre segundo método de Yemm e Willis (1954).

O volume final foi imediatamente agitado e aquecido em banho -maria a 100°C, por 3 minutos. Soluções-padrão de dextrose (dextrose anidropô da BARKER ANALYSED REAGENT, J. T. Barker produtos químicos lta.) em concentrações entre 0 e 200 ug por ml A absorvância foi lida em espectrofotômetro VARIAN a 620 nm.

n. extração e dosagem de hormônios vegetais -

A extração e fracionamento de hormônios vegetais foi feita segundo método de Valio (1969) modificado por Usberti (1979), que será descrito em n_{iii}.

n_i. quantificação da sensibilidade do método de fracionamento para giberelinas

A fim de se conhecer a quantidade de giberelinas perdida durante o método de fracionamento, testou-se a metodologia em experimentos preliminares. Em funil de fracionamento foram colocados 10 ml de solução de ácido giberélico a 50 ppm, em pH 3,0. Ao final do fracionamento obteve-se uma fração em acetato de etila, com volume igual a 100 ml, tendo teoricamente a concentração de 50 ppm. Desta fração foram feitas diluições de 0,5 ppm, aplicando-se 1 ml em papel de cromatografia Whatman n° 3.

Também foram corridos cromatogramas controle, onde foi aplicado apenas 1 ml de acetato de etila. Os cromatogramas controle e aqueles em que foi aplicado ácido giberélico, depois de corridos, foram utilizados para biotestes de hipocótilo de alface, descrito posteriormente.

n_{ii}. padronização do bioteste de hipocótilo de alface, para giberelinas e do bioteste de cotilédones de rabanete, para citocininas, ambos descritos a seguir.

A padronização de biotestes foi feita aplicando-se várias concentrações de ácido giberélico e de 6-benziladenina, até que se obtivesse uma linearidade entre o aumento da concentração de ácido giberélico e o comprimento do hipocótilo de alface, ou entre o aumento da con-

centração de benziladenina e o peso fresco dos cotilédones de rabanete.

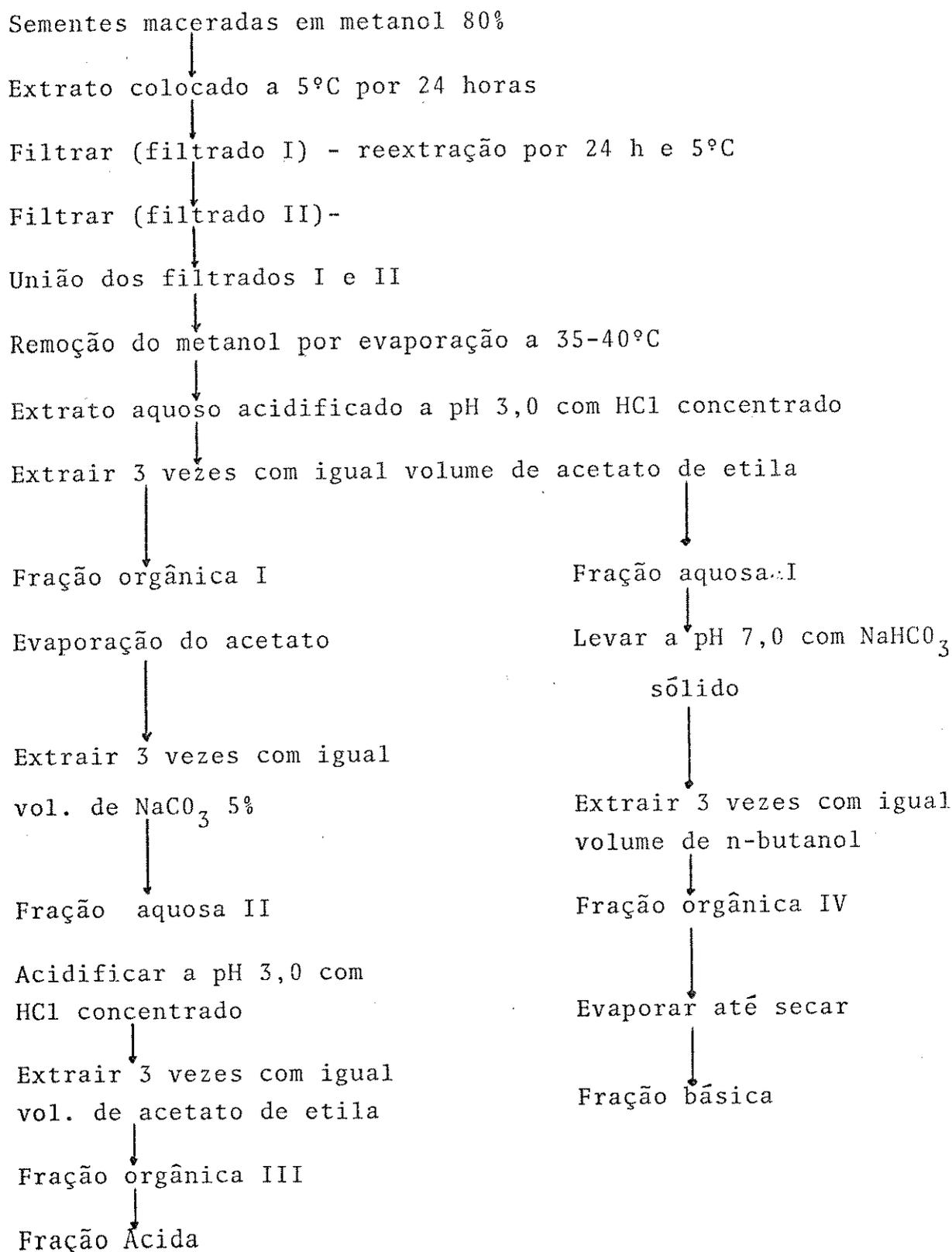
n.iii. extração e dosagem de giberelinas e citocininas -
de extratos de sementes de feijão

Na página seguinte é apresentado o método de extração.

Duzentas sementes de feijão de peso seco conhecido, com tempos de embebição entre 6 e 30 horas, foram colocadas em nitrogênio líquido, por 10 minutos, e maceradas em liquidificador com 400 ml de metanol 80%. Os extratos foram colocados em refrigerador por 24 horas. Após este período a amostra foi filtrada a vácuo, sendo o filtrado (filtrado I) colocado em novo frasco, e os resíduos novamente colocados em 400 ml de metanol 80%, para nova extração. Os dois frascos voltaram para o refrigerador por mais 24 horas, quando então foi feita nova filtração a vácuo e o filtrado obtido (filtrado II) foi juntado ao filtrado I. Procedeu-se então, à remoção do metanol, em evaporador a vácuo, sob pressão reduzida e temperatura entre 35 e 40°C.

A etapa seguinte foi o fracionamento do extrato aquoso, cujos passos estão referidos no esquema anexo. As frações ácidas e básicas obtidas pelo método de fracionamento foram cromatografadas em papel Whatman nº 3. O desenvolvimento foi descendente, em um percurso de 30cm, realizado em cubas de cromatografia previamente saturadas com o sistema de solventes Isopropanol, amônia e água, na proporção de 10:1:1. Depois de corridos num tempo de aproximadamente 8 horas, os cromatogramas foram secos em correntes de ar e armazenados a 4°C até serem biotestados. Os cromatogramas foram divididos em 10 faixas transversais, correspondentes aos R_fs de 0,1 a 1,0. Estas faixas foram divididas em 3 partes iguais, obtendo-se 30 porções de 3x4 cm, por cromatograma. Cada uma destas porções foi colocada ao acaso em formas de polietileno para biotestes e umidecidas com água destilada. Como controle utilizou-se cromatograma onde só correu o sistema de solventes. Também foram utilizadas soluções-padrão de ácido giberélico, em concentração de 0,0312; 0,0625; 0,1; 0,125; 0,375; 0,5; 0,625 e 1,0 ug/ml e concentrações de benziladenina de 0,01; 0,1 e 1,0 ug/ml que davam uma relação linear entre a concentração aplicada e o efeito por elas provocado.

As giberelinas extraídas dos tecidos vegetais, contidas nos cromatogramas, foram dosadas através de bioteste de

MÉTODO DE EXTRAÇÃO

hipocótilo de alface (Lactuca sativa v. "Grands Rapids") segundo o método de Frankland e Wareing (1960), modificado por Cherry (1973). Sementes de alface foram colocadas por 24 horas a 25°C, sob luz contínua. Após este período foram selecionadas plântulas por homogeneidade de tamanho, as quais foram colocadas 4 a 4 em cubetas de formas de polietileno, em contato com 1/3 de cada uma das faixas correspondentes a cada RF, ou em contato com soluções-padrão de ácido giberélico, ou com água destilada. Previamente foi adicionado em cada cubeta 1 ml de água destilada, com 1 ml de solução padrão de ácido giberélico. A seguir as cubetas foram transferidas para câmaras de crescimento a 25°C, sob luz contínua por cerca de 72 horas, quando então foi medido o comprimento dos hipocótilos de alface. O comprimento dos hipocótilos crescidos em cada faixa do cromatograma foi comparado ao dos crescidos em água ou nas soluções de ácido giberélico.

As citocininas dos extratos foram dosadas através de biotestes de cotilédones de rabanete (Letham, 1968). Substâncias com atividade citocinínica promovem o aumento em peso fresco de cotilédones de rabanete, devido principalmente a maior absorção de água. Sementes de rabanete (cv "Vermelho redondo") foram colocadas para germinar em placas de Petri a 25°C, por um período de 24 horas. Após este tempo, os cotilédones externos foram retirados, os quais foram selecionados por tamanho e colocados, 3 a 3, em cubetas de polietileno, em contato com 1/3 de cada uma das 10 faixas de Rf, ou em contato com soluções-padrão de benziladenina, ou ainda em contato com água destilada. Previamente haviam sido adicionados em cada cubeta 2 ml de água destilada, ou 2 ml de solução padrão de benziladenina. A seguir as cubetas foram transferidas para 25°C, sob luz contínua, onde permaneceram por 6 dias. Após este período foi medido o peso fresco dos cotilédones.

Quando necessário foi feita a análise estatística, sendo calculado o valor de F e o intervalo mínimo significativo (L.S.R.) de acordo com Sokal e Rohf (1969).

RESULTADOS

1. Caracterização do material

Para o estudo de utilização de reservas durante o crescimento inicial de plantas de feijão foi necessário caracterizar o material com a finalidade de se estabelecer parâmetros como peso seco e conteúdo protéico do embrião e cotilédones já na semente seca.

A faixa de peso das sementes a ser utilizada nos experimentos foi escolhida tomando-se ao acaso 100 sementes de feijão e verificando a distribuição normal de peso destas sementes.

Noventa e cinco por cento das sementes encontravam-se entre 150 mg e 270 mg e 66% restringiam-se entre a faixa de 180 mg e 240 mg. Por esta razão determinou-se esta última faixa, para as sementes a serem utilizadas em experimentos futuros.

O peso seco do embrião foi determinado utilizando-se a média de 50 embriões de sementes na faixa de peso escolhida. O valor obtido foi de 3,5 mg de peso, equivalendo a 1,6% do peso da semente toda (tab. 1) incluindo-se o envoltório que corresponde a 18 mg de peso ou a 7,6% do peso total da semente.

Foi determinado também o teor de hidratação da semente não embebida. Pela figura 2a nota-se que a porcentagem de água na semente foi quase constante, independentemente do peso do grão analisado e variando apenas entre 9,3 - 10,5% do peso da semente. Entretanto em termos absolutos, grãos maiores apresentaram maior quantidade de água que grãos menores, tanto que duplicando-se o peso do grão de 140 mg para 280 mg também teve-se duplicado o conteúdo em água, o qual aumentou de 15 mg para 30 mg (Figura 2b).

A quantidade de proteína na semente madura foi determinada, e a correlação entre peso da semente e teor em proteínas, tanto para sementes individuais como para a farinha de várias sementes de uma determinada faixa de peso é mostrada na figura 3.

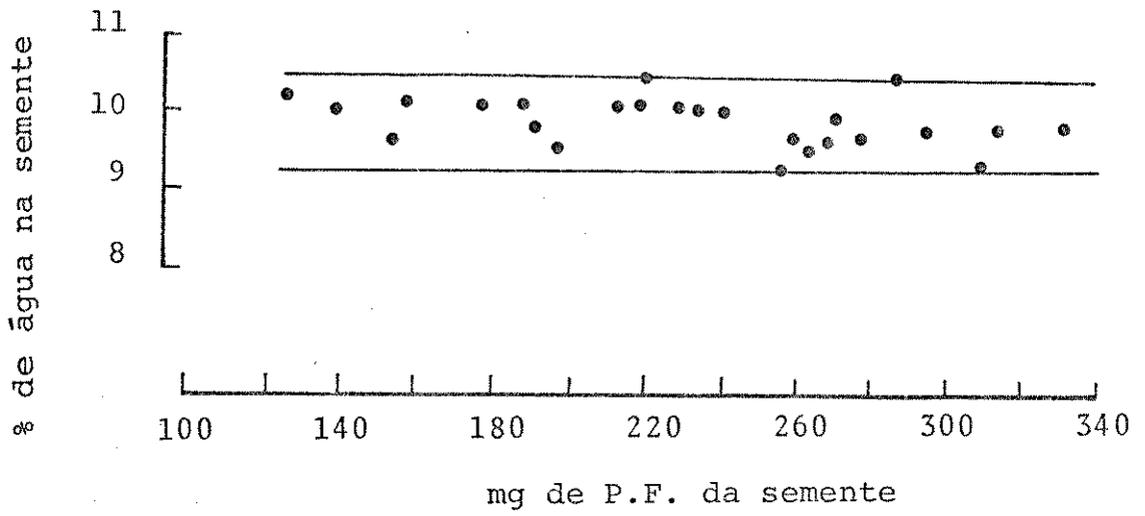
Tanto a análise de sementes individuais, como a da farinha de várias sementes mostrou uma forte correlação ($p < 0,001$) entre os dois parâmetros observados, sendo que grãos maiores apresentaram conteúdo protéico em termos absolutos, de tal forma que

FIGURA 2a. Porcentagem de água em sementes não embebidas de feijão na faixa de peso entre 120 - 340 mg.

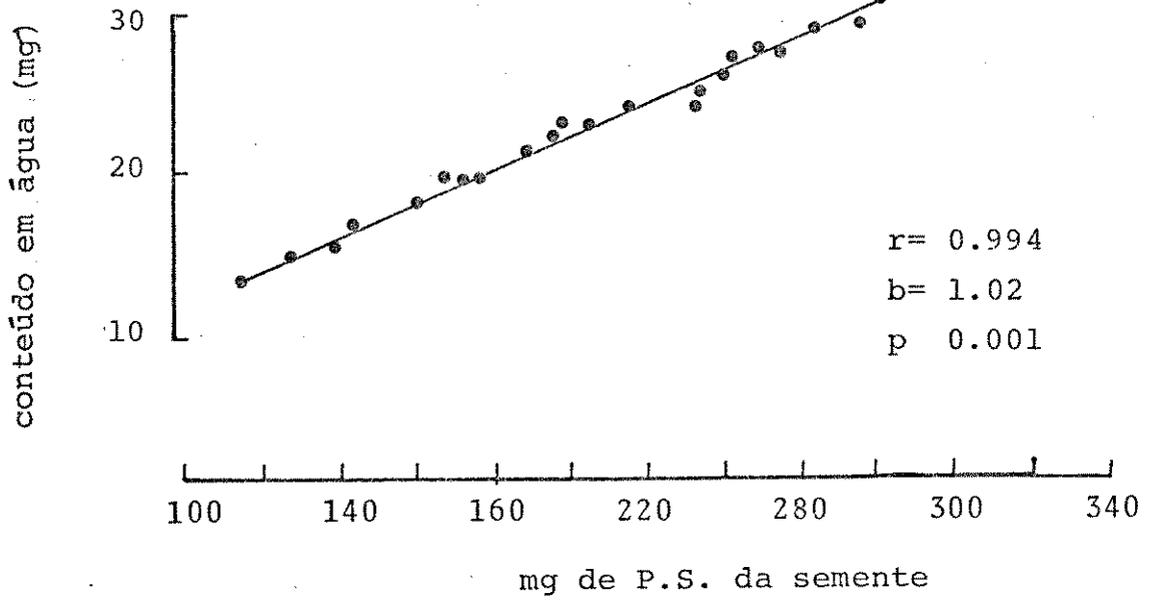
FIGURA 2b. Conteúdo de água em sementes não embebidas de feijão na faixa de peso entre 120 - 340 mg.

FIGURA 2

a



b



um aumento de 1 mg de peso correspondeu a um aumento de 0,2 mg de proteína. Dentro da faixa de peso escolhida, o conteúdo protéico variou entre 30 e 40 mg. Entretanto porcentagem de proteína por semente foi mais ou menos constante dentro das faixas de peso analisadas, correspondendo entre 16 e 18% do peso da semente (fig. 3b).

O conteúdo protéico do embrião, média de 50 embriões de sementes da faixa normal de peso escolhido, foi de 0,61 mg em termos absolutos, correspondendo a 1,6% da quantidade total de proteína da semente. Em termos relativos, entretanto, tanto embrião como cotilédones apresentaram a mesma concentração de proteínas, ou seja, 170 ug/mg de tecido (tab. 1).

2. Germinação e crescimento inicial

A análise de absorção de água pela semente durante os primeiros dias de germinação é mostrada nas figuras 4a. e 4b.

Nas primeiras 4 horas de embebição houve um rápido aumento exponencial em peso fresco (fig. 4a,b).

Após este período de absorção de água foi mais lenta, apresentando as sementes, durante as 24 horas seguintes de embebição, um aumento de peso fresco de apenas 3 mg/h em contraposição ao aumento de 36 mg/h sofrido por estas sementes nas primeiras 4 horas de embebição.

O crescimento do embrião, em termos de peso seco, foi observado durante 48 horas de embebição da semente. A figura 5a. mostra que nas primeiras 20 horas não houve aumento de peso seco do embrião. Após este período foi observada uma mudança marcante no crescimento do embrião que teve seu peso seco aumentado exponencialmente (fig. 5b). Durante este tempo os cotilédones apresentaram apenas uma ligeira diminuição de peso, indicando que a hidrólise das reservas ainda estava se principiando.

A figura 6 (de a até e) mostra absorção de oxigênio pelas sementes durante vários períodos de embebição. A observação das figuras individuais mostra que por pequenos períodos a taxa respiratória pareceu linear com o tempo. Entretanto, tomando-se as três primeiras figuras em sequência, as quais analisam a respiração da semente nas primeiras 6 horas da embebição (fig. 6a-6c)

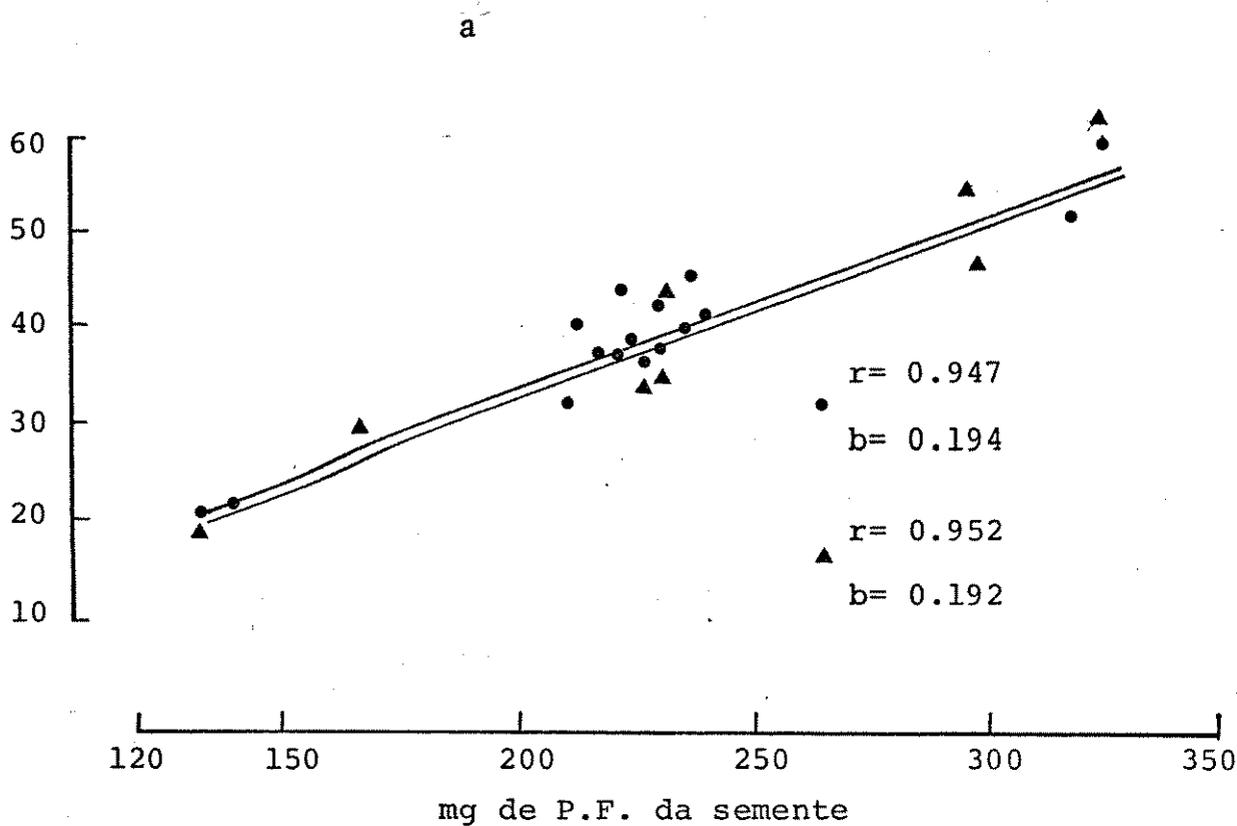
TABELA 1 - Peso fresco, conteúdo protéico, concentração protéica e a porcentagem de proteína em cotilédones e embriões de feijão. Cada valor representa a média de 50 sementes na faixa de peso de 180-240mg.

	Peso fresco (mg)	conteúdo protéico (mg)	concentração de proteína (μ g de prot./mg P.F.)
cotilédones	225,0	38,7	171,8
embrião	3,5	0,61	173,0

FIGURA 3. Conteúdo de proteína (fig. 3a) e porcentagem de proteína (fig. 3b) em sementes não embebidas de feijão na faixa de peso entre 120 - 340 mg. (●) valores para sementes individuais; (▲) valores para a farinha de várias sementes de feijão em várias faixas de peso.

FIGURA 3

conteúdo proteico da semente (mg)



proteína na semente (%)

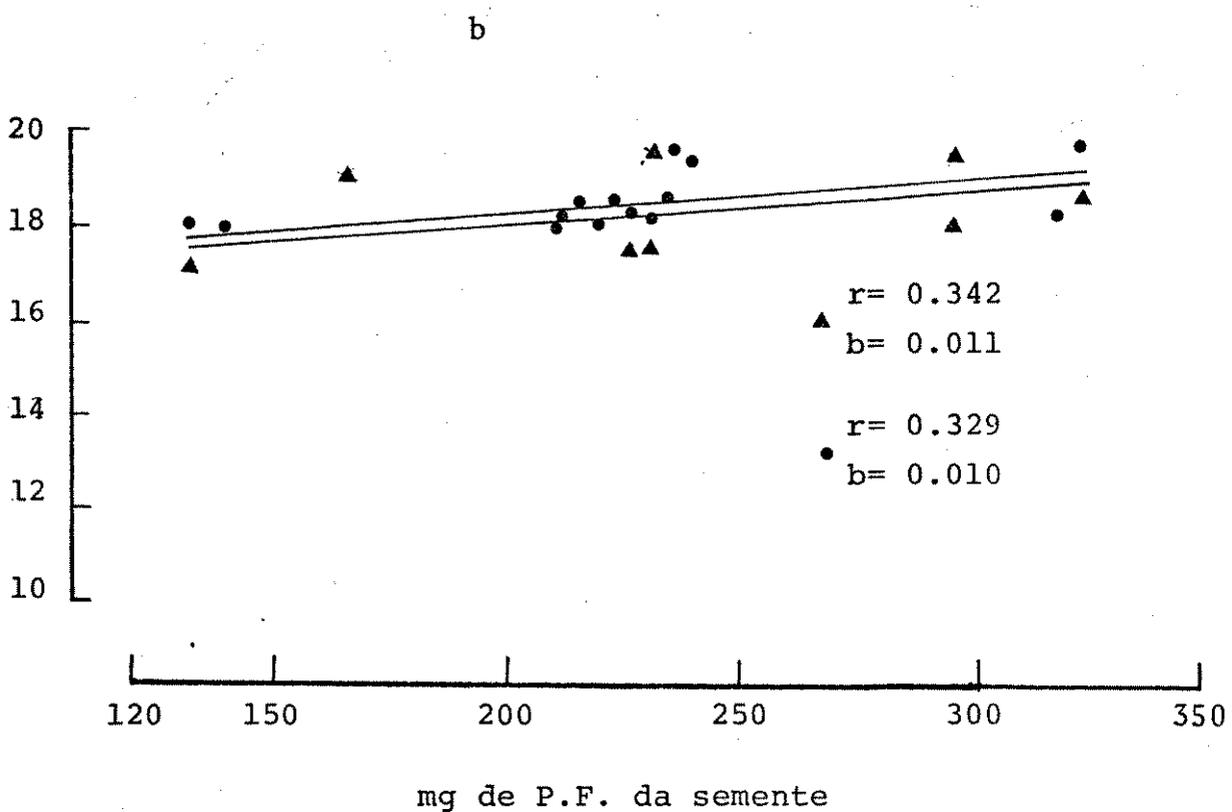


FIGURA 4. Absorção de água pela semente de feijão, em termos de mg de peso fresco (fig. 4a) ou \log_{10} do peso fresco (fig. 4b), durante 28hs de embebição. Cada ponto representa a média de 25 sementes.

FIGURA 4

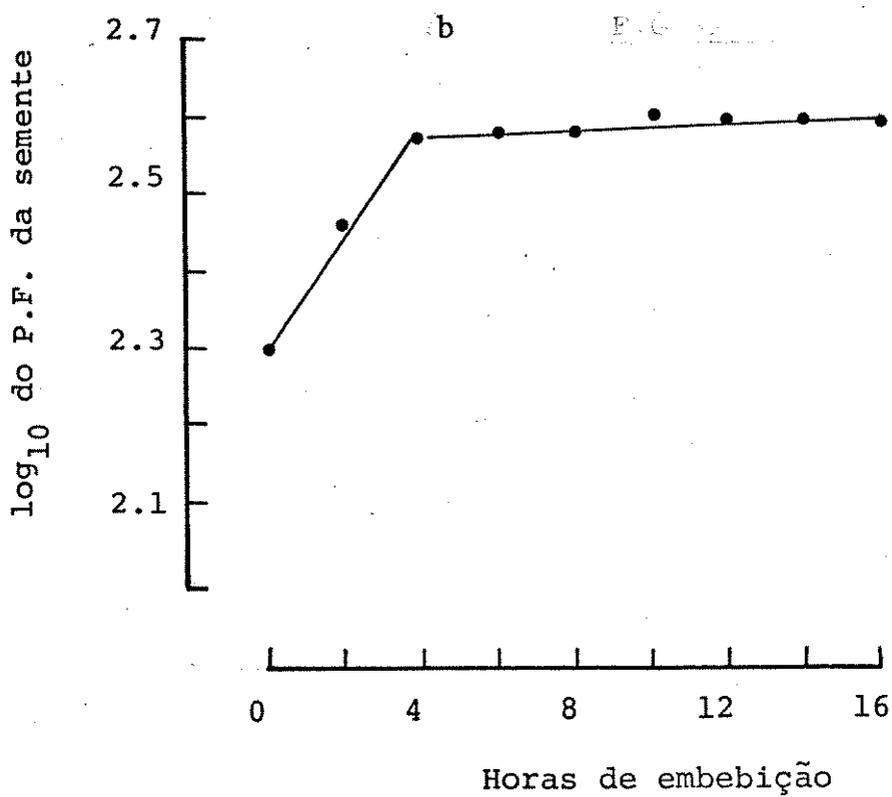
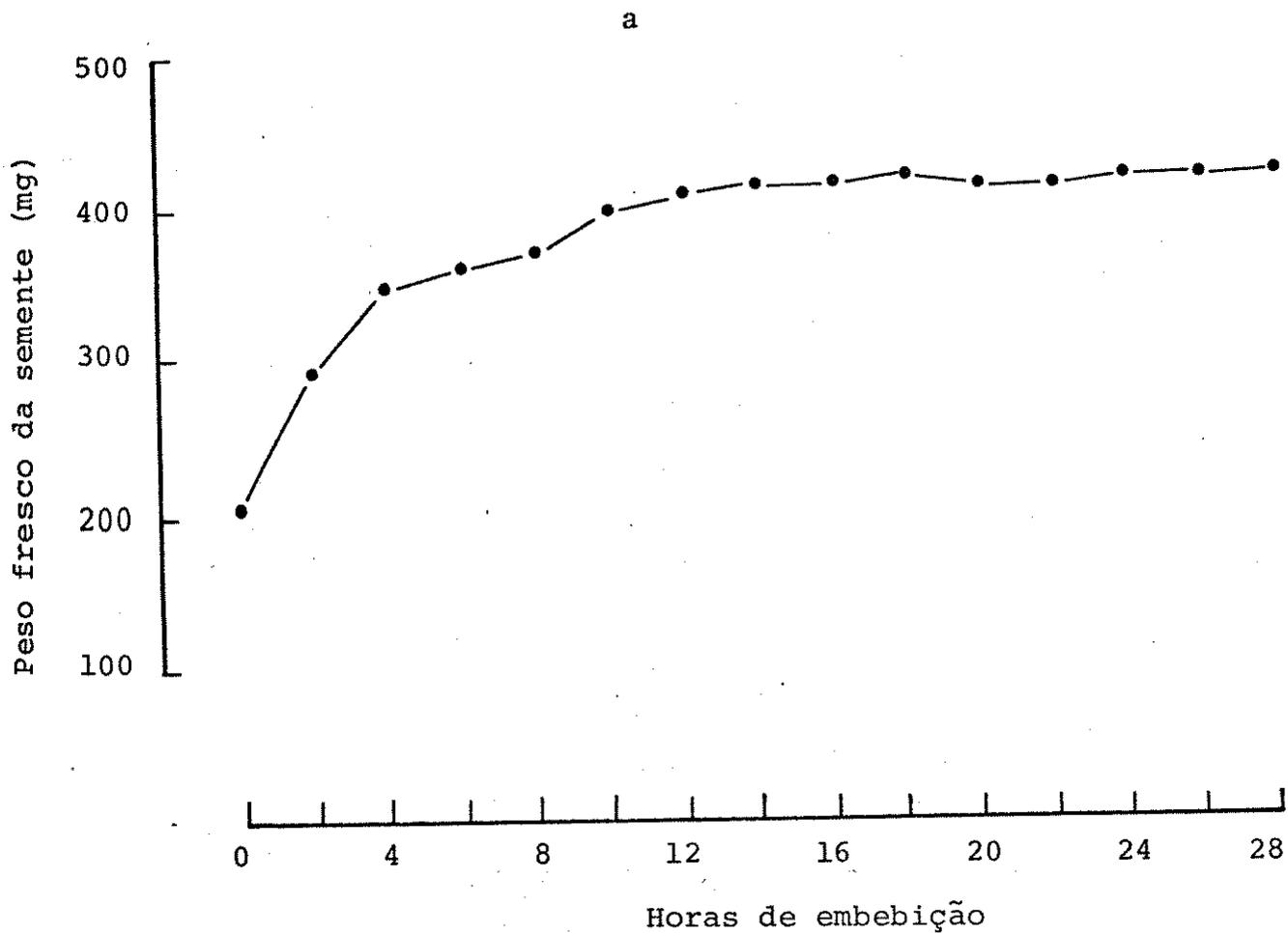
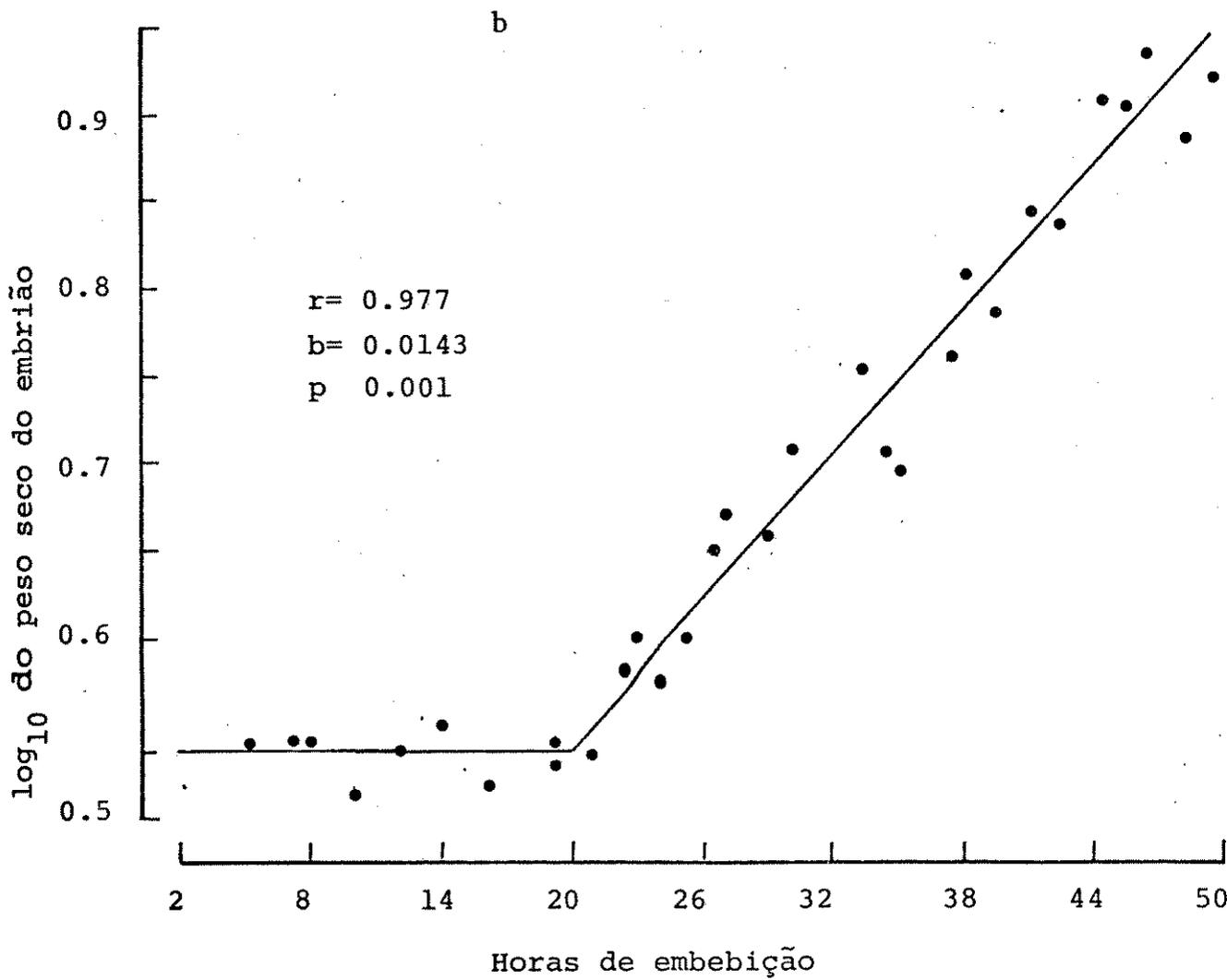
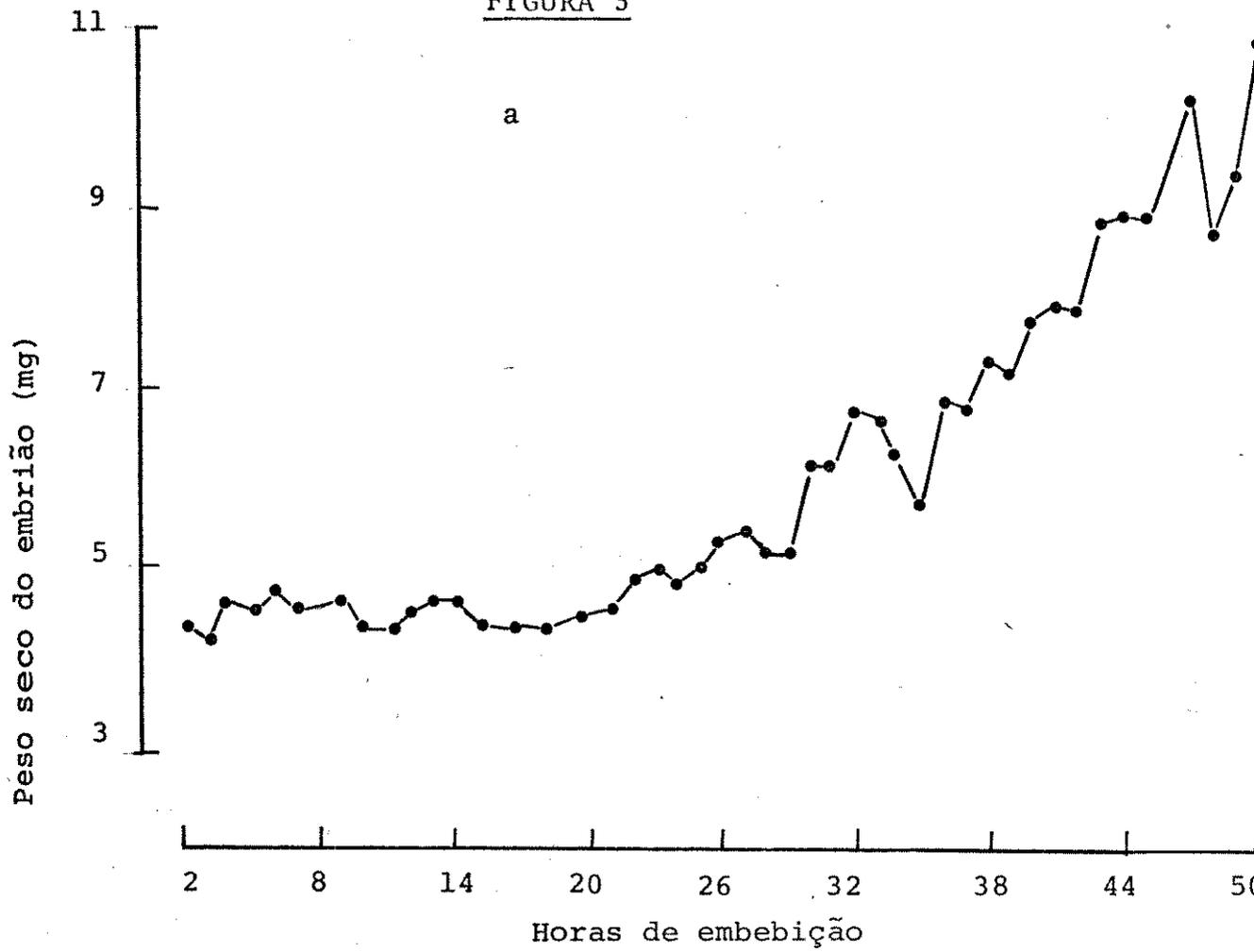


FIGURA 5. Mudanças no peso seco do embrião de feijão, em termos de mg de peso seco (fig. 5a) ou \log_{10} do peso seco (fig. 5b), durante as primeiras 48hs de embebição da semente. Cada ponto representa a média de 15 embriões.

FIGURA 5



vê-se pela inclinação das retas que a taxa de absorção de oxigênio teve um aumento progressivo. Já em sementes com maiores períodos de embebição a taxa respiratória, apesar de maior que as anteriores continuou linear por um espaço de tempo mais longo (fig. 6d). Estes dados sugerem que as mudanças na taxa de respiração foram muito mais aceleradas nas primeiras horas que em períodos posteriores da embebição, tanto é que até 6 horas de embebição foi possível detectar 4 alterações na taxa respiratória observando linearidade por períodos de tempo equivalentes a uma hora (fig. 6a - 6c). Assim, até 3 horas consecutivas de embebição foi possível detectar mudanças na taxa de absorção de oxigênio entre 1 e 2 horas e entre 2 e 3 horas (fig. 6a).

Mais tarde parece que a taxa respiratória permaneceu constante por maiores períodos de tempo (fig. 6d). Também foram analisadas as taxas respiratórias de embriões isolados de sementes com 20 a 22 e 40 a 42:30/ horas de embebição (fig. 7a-7b). Novamente a absorção de oxigênio pareceu linear por curtos períodos de tempo. Comparando a respiração de sementes intactas (fig. 6d) e embriões isolados (fig. 7a) entre 20 e 22 horas, pode ser visto que, em termos absolutos, a semente intacta absorveu, neste período, ao redor de 150 ul de oxigênio, comparados com os 60 ul absorvidos pelo embrião. Desta forma, o embrião contribuiu com 40% do total de oxigênio absorvido pela semente intacta. Analisando-se os dados de taxa respiratória em termos de ul de O_2 respirados/minuto, levando-se em consideração dados das fig. 6d e 6e, observou-se que as mudanças na absorção de oxigênio em sementes apresentaram uma curva onde as alterações na taxa respiratória foram diminuindo com o decorrer do tempo de embebição da semente. (fig.8). Assim entre 0 e 20 horas a taxa teve um aumento de quase 1,2 ul de O_2 /min., enquanto que nas 20 horas posteriores ela foi para 1,6 ul de O_2 /min ou seja, 1/3 do aumento anterior. A taxa de respiração do embrião também é mostrada na figura 8, onde observa-se que no período analisado, entre 20 e 42:30 horas, a taxa respiratória do embrião foi cerca de 40 e 50 % da taxa respiratória de semente intacta.

Para o estudo de mobilização de reservas durante o crescimento inicial de plântula de feijão foi necessária estabelecer uma curva de crescimento de planta, observando o desenvol

FIGURA 6. Mudanças na respiração de sementes de feijão durante 55hs de embebição. Cada ponto representa a média de 6 sementes.

FIGURA 6

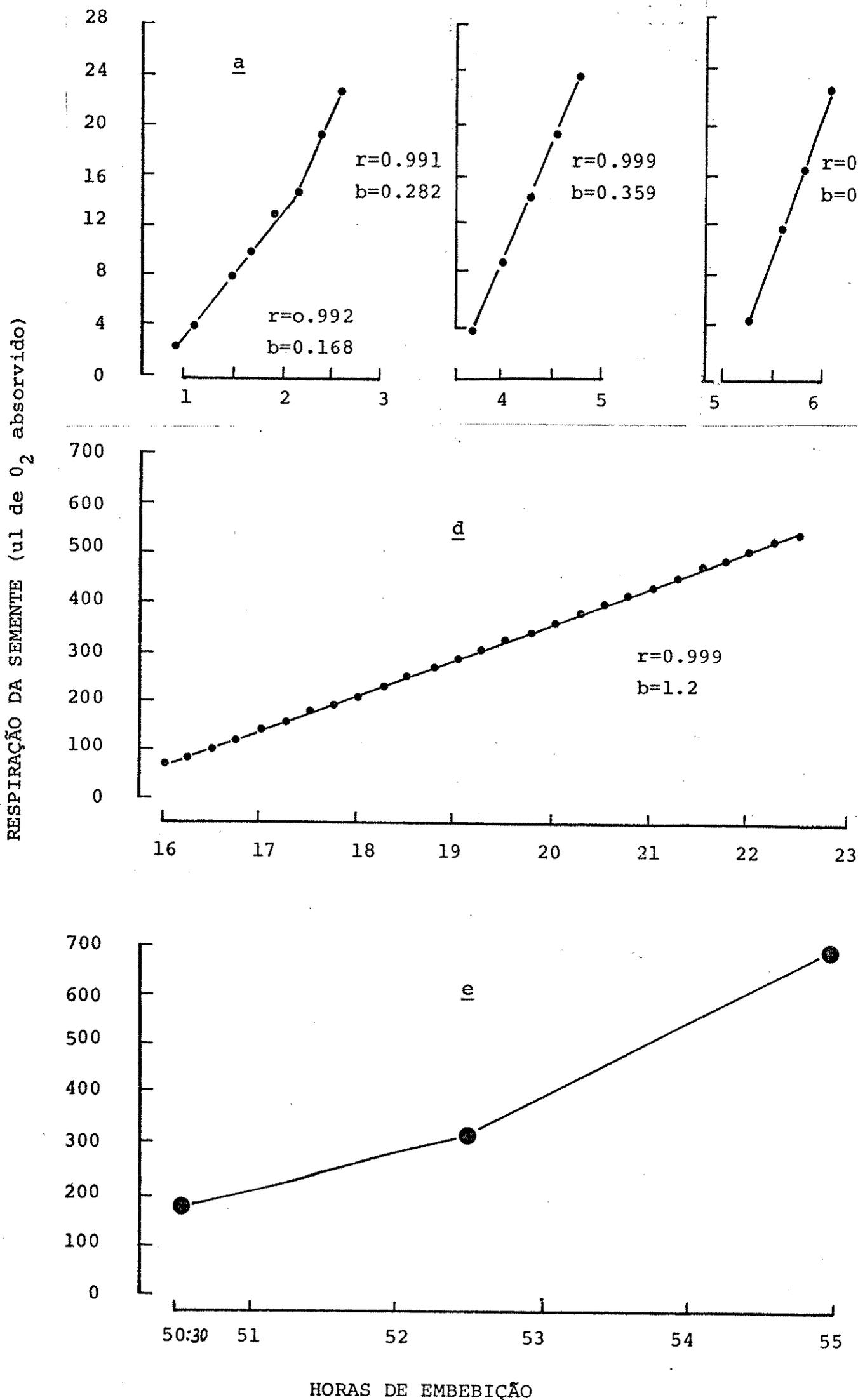


FIGURA 7. Respiração de embriões de feijão entre 20 e 42hs de embebição. Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 7

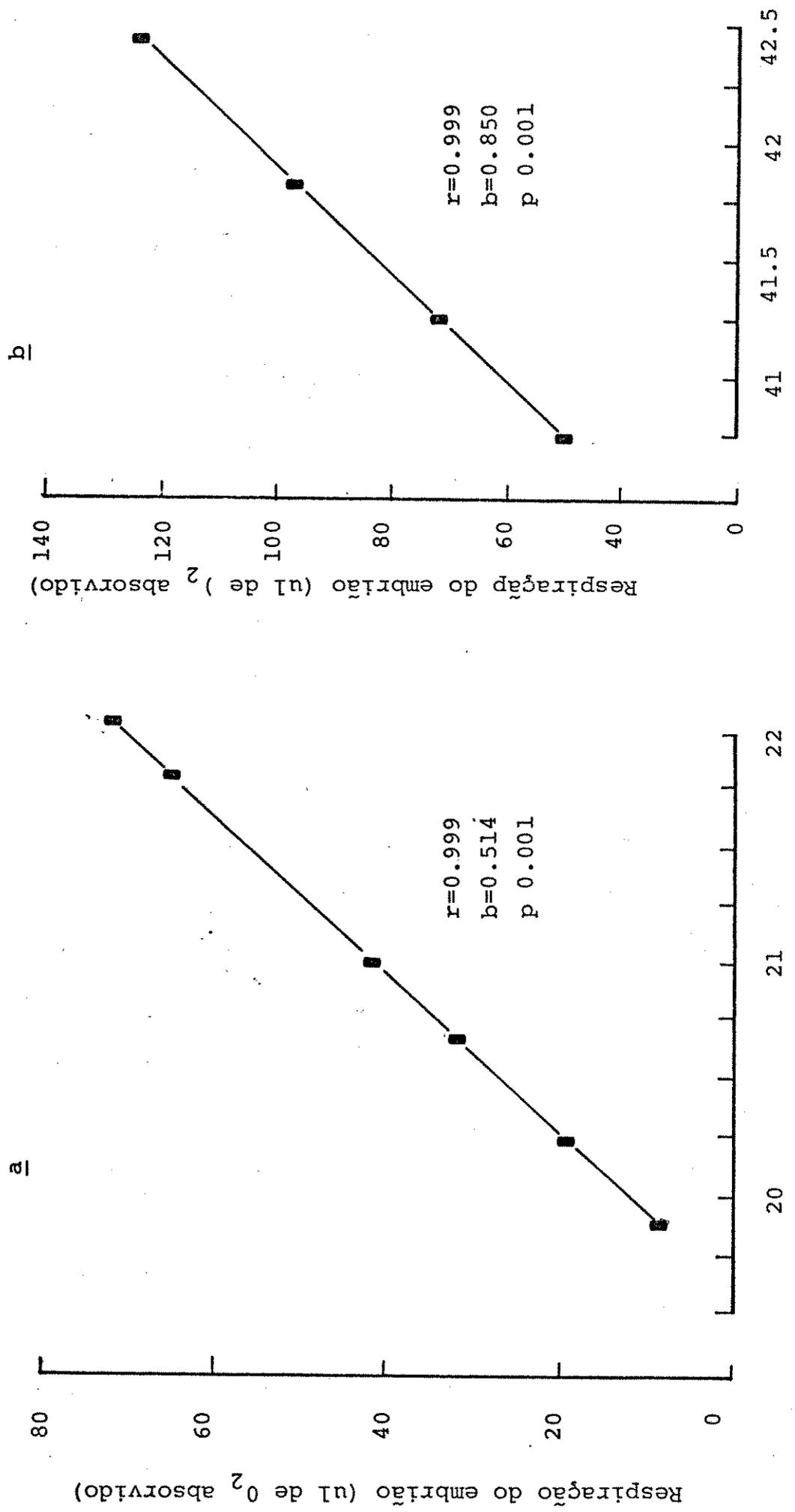
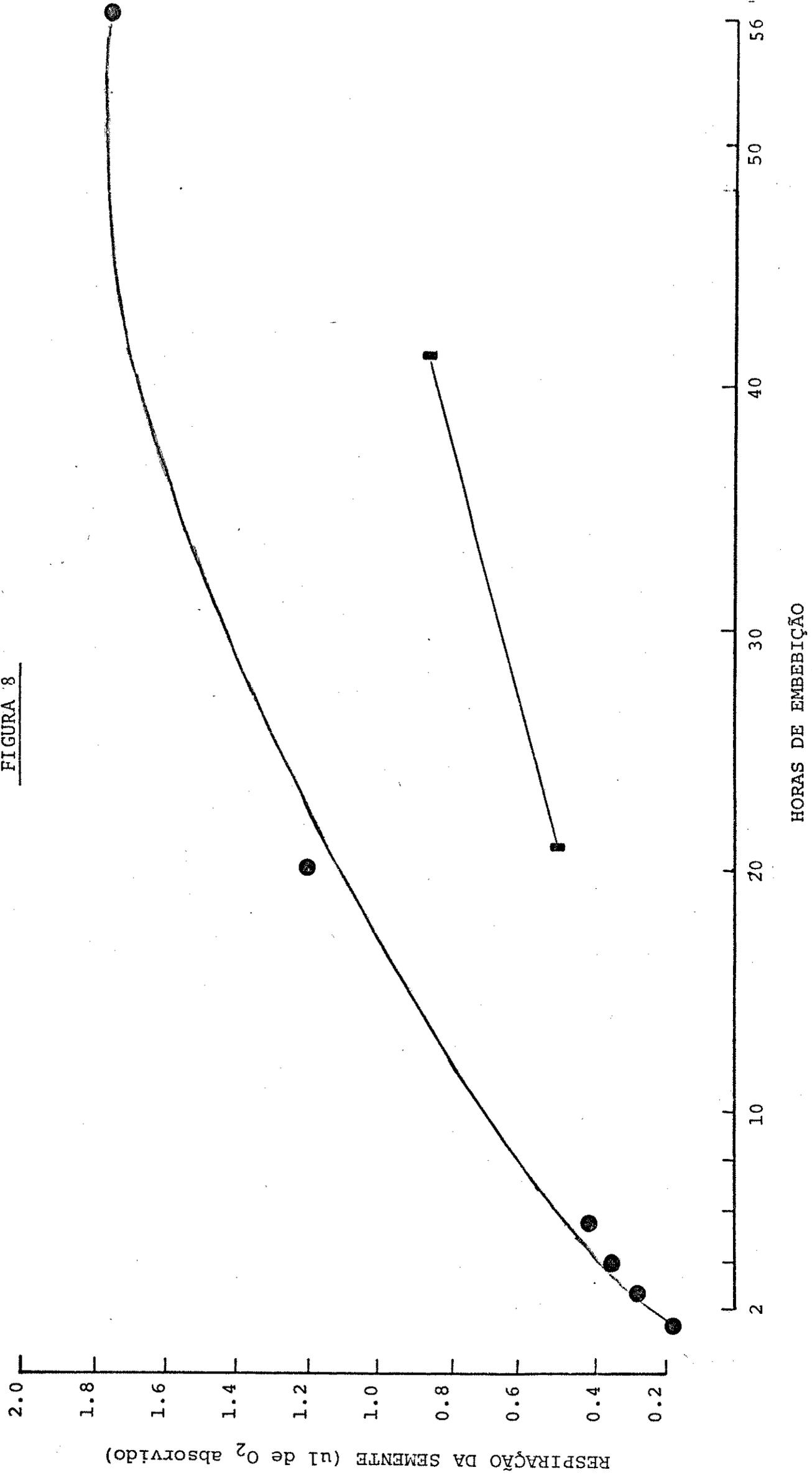


FIGURA 8. Mudanças na taxa respiratória de sementes (●) ou embriões (■) durante as primeiras horas de embebição. Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 8



vimento de cada órgão independentemente, em particular sobre o primeiro par de folhas, que antes de se tornar a principal fonte de fornecimento de carbono da planta jovem, teve seu crescimento, dependente das reservas de semente.

As mudanças em peso seco dos órgãos da planta de feijão até a senescência do primeiro par de folhas, que se deu por volta do 27º dia de crescimento, são vistas na figura 9.

A curva de peso seco dos cotilédones mostra que a reserva cotiledonar foi completamente utilizada por volta do 8º dia de crescimento, e portanto, o crescimento observado nos outros órgãos depois deste período foi devido a fotossíntese da parte aérea. A queda no peso seco total da planta, entre os dias 3 e 7, foi devido a perdas respiratórias durante a utilização das reservas cotiledonares. Depois deste período houve um aumento contínuo e linear no peso seco total.

As raízes também cresceram continuamente até o 27º dia, mas em menor proporção que a parte aérea.

O primeiro par de folhas aumentou em peso seco até o 17º dia, sendo que a taxa de crescimento maior nos primeiros 11 dias. O crescimento das folhas foi estudado em mais detalhe, analisando-se peso fresco, e peso seco, conteúdo de clorofila, conteúdo protéico e área foliar. (fig. 10 e 11).

O peso fresco é a área do primeiro par de folhas apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento (Fig. 10a) e foram fortemente correlacionados ($r = 0,999$), (fig. 10b). Como observado para peso seco, aqui também houve um maior desenvolvimento até o 17º dia de crescimento. Tanto o crescimento em área como em peso fresco ocorreram em duas fases: uma de crescimento mais rápido, entre 4 e 11 dias, e outra mais lenta até o 17º dia.

A queda do peso fresco e a área foliar após o 17º dia foi devido à senescência acelerada das folhas, uma vez que não foi dada à planta nutrição. As folhas apresentaram áreas de necrose.

O conteúdo de proteína e clorofila seguiram o mesmo padrão de desenvolvimento, alcançando um valor máximo no 17º dia de crescimento e então, e começou rapidamente a decrescer devido à senescência das folhas (fig. 11a.). O conteúdo em clorofila e proteína foi fortemente correlacionado ($r = 0,984$), (fig. 11b).

FIGURA 9. Mudanças no peso seco total (□), parte aérea (○), folhas (△), raízes (▼) e cotilédones (●) durante os primeiros 24 dias de crescimento da planta de feijão. Cada ponto representa a média de 6 valores.

(---) ausência de folhas devido à queda.

FIGURA 9

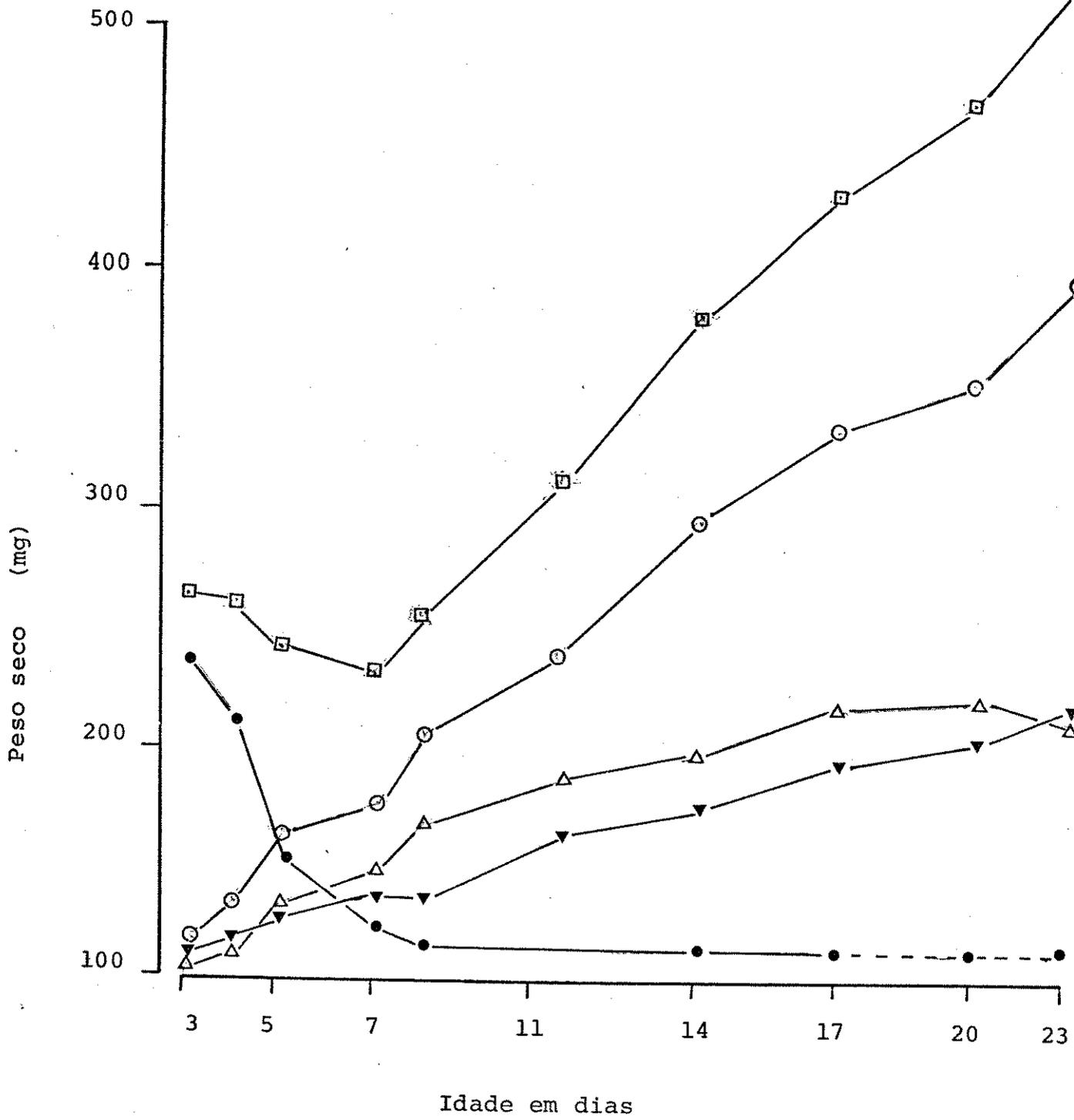


FIGURA 10a. Mudanças no peso fresco a área de folhas primárias de feijão durante os primeiros 27 dias de crescimento. Cada ponto representa a média de 6 valores. Peso fresco (\blacktriangle), área foliar (\bullet).

FIGURA 10b. Correlação entre área foliar e peso fresco de folhas primárias de feijão. Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 10

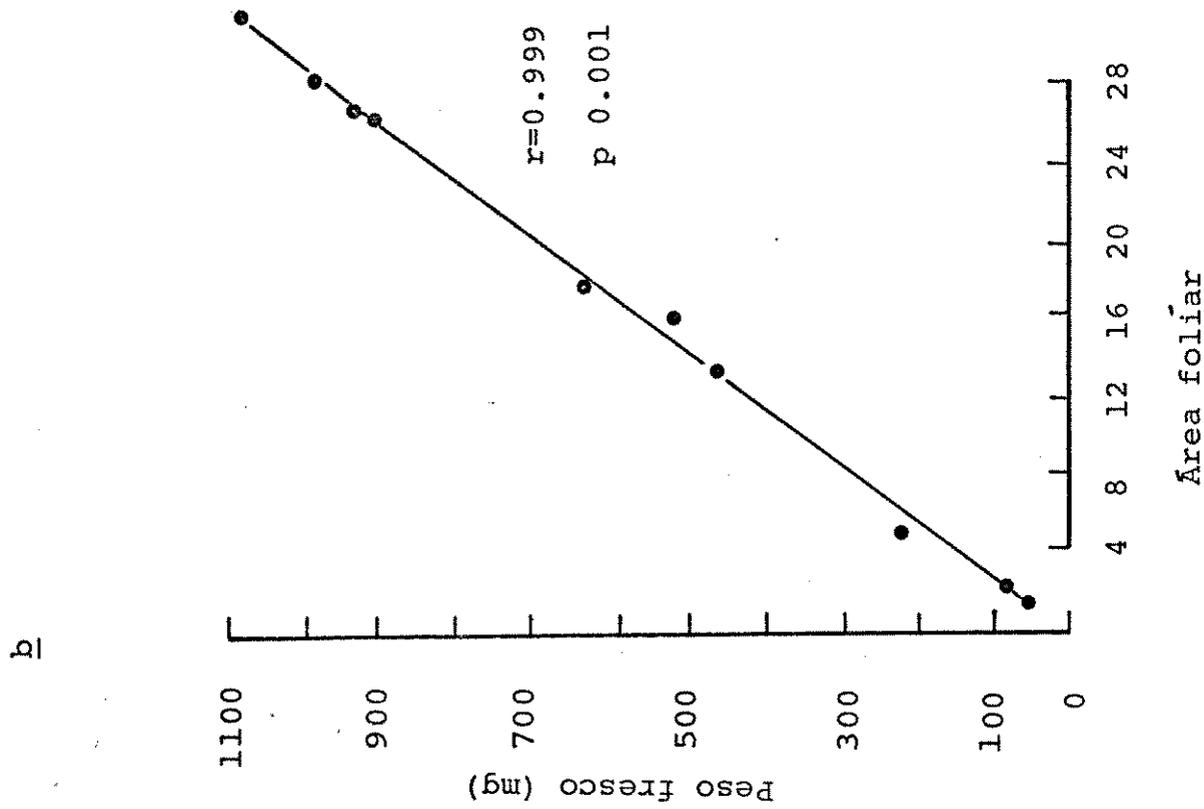
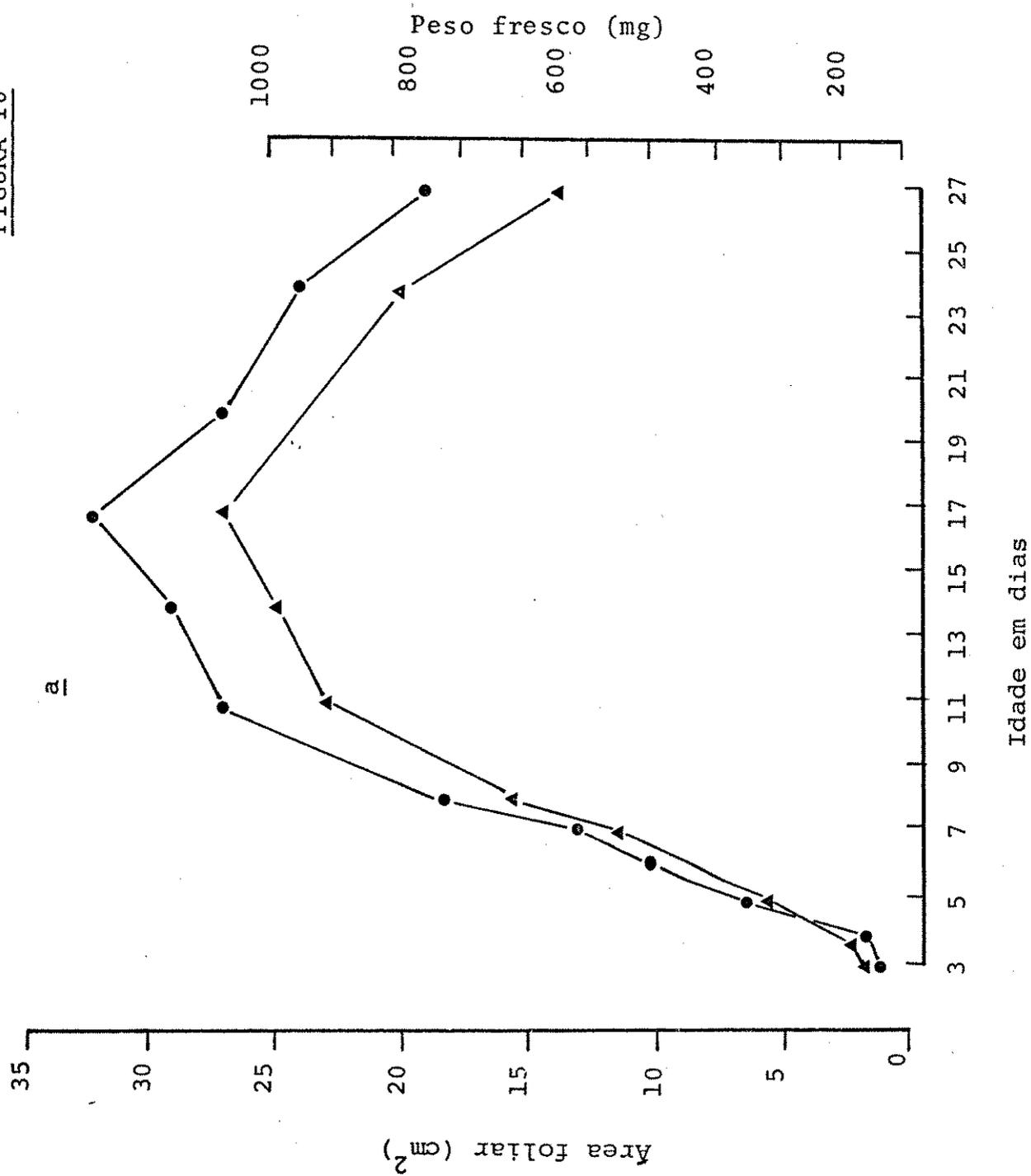
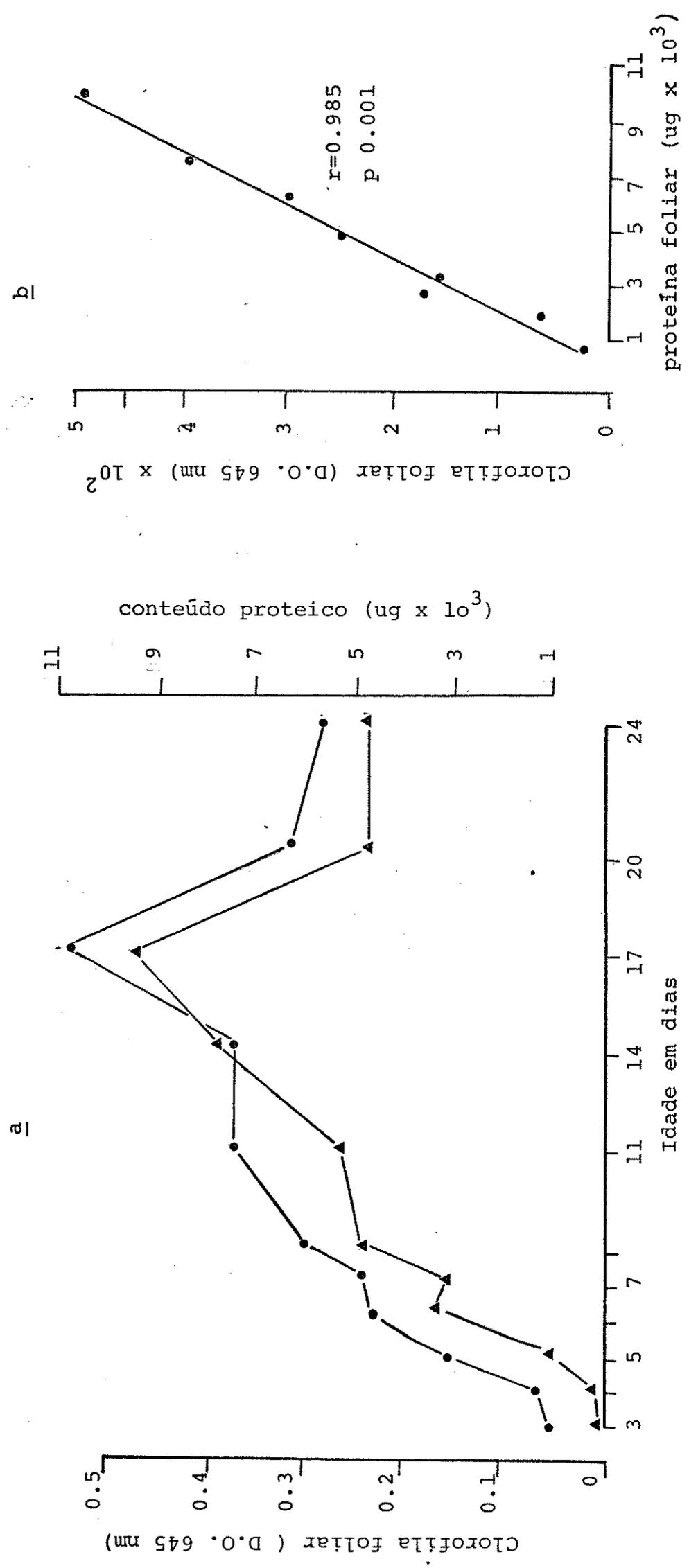


FIGURA 11a. Mudanças no conteúdo protéico e de clorofila em folhas primárias de feijão durante 27 dias de crescimento da planta. Conteúdo protéico (●), conteúdo de clorofila (▲).

FIGURA 11b. Correlação entre conteúdo protéico e clorofila em folhas primárias de plantas de feijão. Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 11



O logarítmo da concentração de clorofila e proteína mostrou que tanto uma como outra aumentaram em duas fases distintas, uma mais rápida até o 6º dia, seguida de outra mais lenta, até o 17º (fig. 12a e 12b). Estes dados mostraram que a maior parte da síntese de clorofila e proteína ocorreu na folha jovem antes que expansão atingisse 30% de seu desenvolvimento final.

Tendo sido estabelecido que a mobilização completa das reservas dos cotilédones para a planta se deu até o 8º dia de crescimento, novos estudos foram feitos sobre o crescimento da planta durante este período. O crescimento da plântula foi contínuo e linear (fig. 13a) durante o período analisado, entretanto o peso seco total sofreu um decréscimo devido à oxidação de substratos respiratórios: entre os dias 2 e 4 a diminuição em peso foi 10 vezes maior que entre os dias 4 e 8 (fig. 13a). A diminuição na perda de peso depois do 4º dia de crescimento foi devido à fixação de carbono pelas primeiras folhas, que nesta época tiveram uma rápida expansão (fig. 13a). Quando a área foliar alcançou 25 cm², no 8º dia de crescimento, a fotossíntese por elas realizada foi capaz de sobrepujar a perda de substratos respiratórios, fazendo com que o peso seco total começasse a aumentar (fig. 13b).

A diminuição de peso dos cotilédones foi acompanhada por um aumento em peso seco da plântula, indicando translocação do material de reserva dos cotilédones, reservas estas que foram totalmente esgotadas até o 8º dia de crescimento.

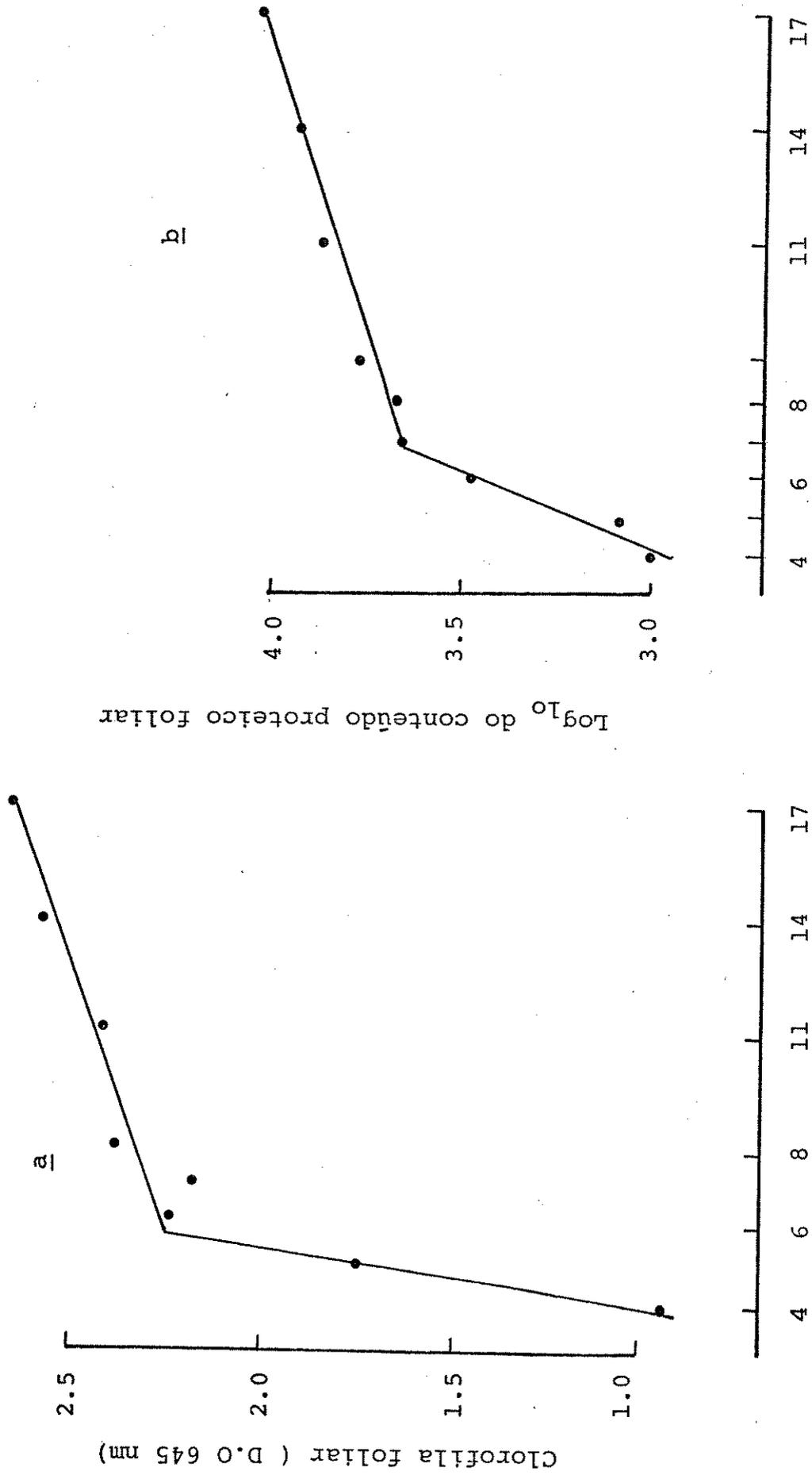
As curvas de peso seco de cotilédones e plântula se cruzaram entre os dias 5 e 6, definindo um ponto que equivale ao tempo em que metade das reservas dos cotilédones foram degradadas.

A taxa de translocação das reservas entre os dias 2 e 6 foi rápida, sendo que entre os dias 4 e 6 foram translocados 30 mg/dia de matéria seca, o que equivale a 1/6 do peso inicial da semente. Entre os dias 6 e 8, a taxa de translocação das reservas foi metade da anterior, 17 mg/dia, e por volta do 8º dia as reservas estavam esgotadas.

Nos primeiros dias de crescimento a taxa da perda de peso seco dos cotilédones não foi correlacionada com a taxa de aumento em peso seco da plântula. Assim, entre os dias 2 e 4, embora os cotilédones tenham perdido bastante peso, o embrião não

FIGURA 12. Log_{10} do conteúdo de clorofila (fig. 12a) e de proteína (fig. 12b) em folhas primárias de feijão durante os primeiros 17 dias de crescimento da planta. Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 12

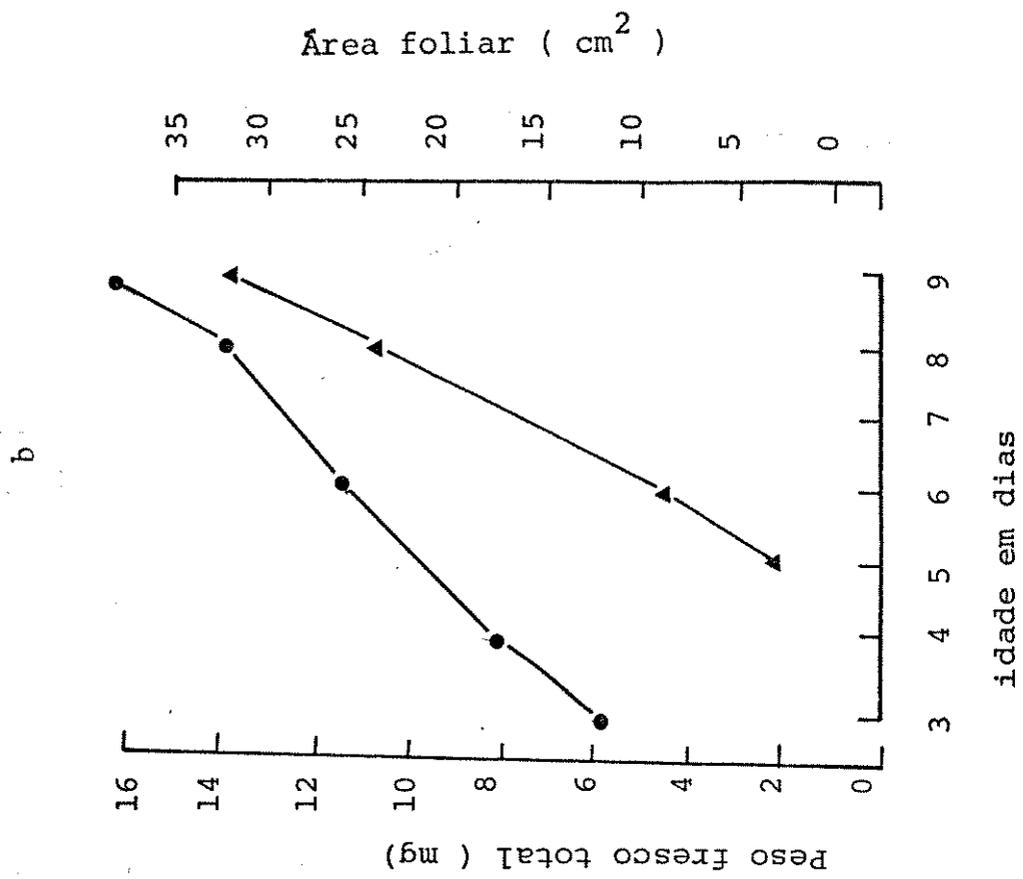
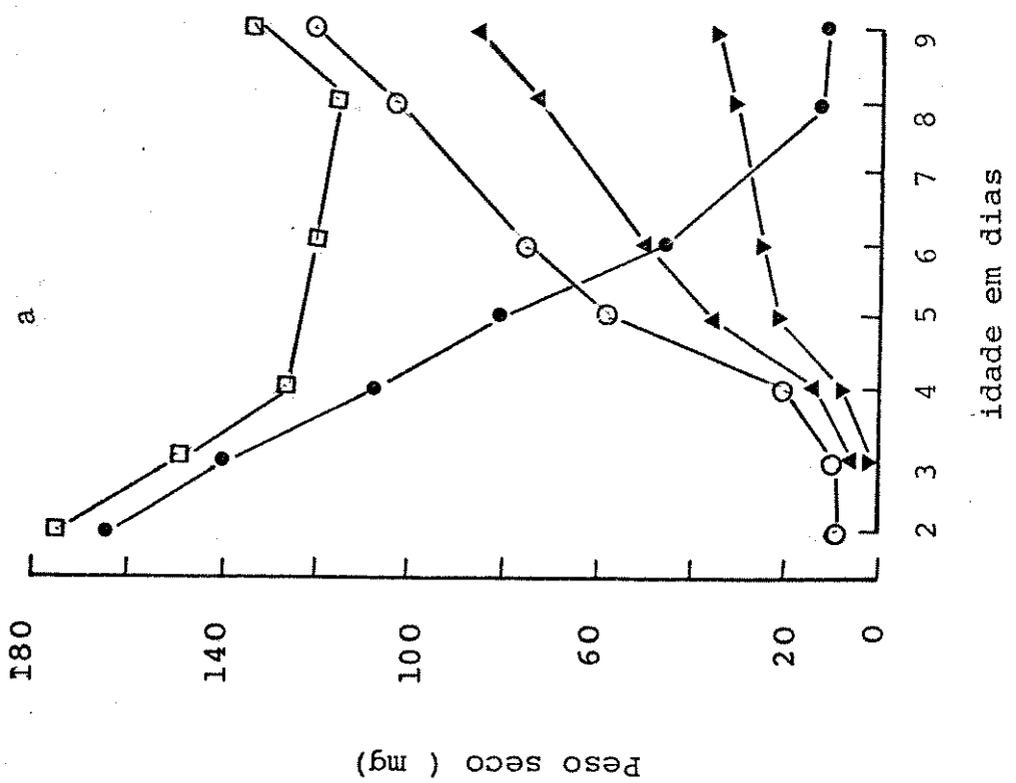


Idade em dias

FIGURA 13a. Mudanças no peso seco total (□), de cotilédones (●), de raiz (▼), da parte aérea (▲) e plântula (raiz + caule + folhas) (○) nos primeiros 9 dias de crescimento da planta de feijão. Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 13b. Mudanças no peso fresco total (●) e área foliar (▲) de plantas de feijão durante os primeiros 9 dias de crescimento. Cada ponto representa a média de 6 plantas.

FIGURA 13



teve um aumento correspondente em peso. Observa-se pela figura 13a que o peso seco do caule foi invariavelmente maior que o peso seco da raiz nos dias analisados, assim, no 9º dia, o peso seco da raiz foi somente 40% do peso do caule.

O passo seguinte nestes estudos foi a análise conjunta do conteúdo de matéria seca e proteína durante o crescimento inicial da planta. Os dados desta análise são mostrados na figura 14.

Mais uma vez foi observado um decréscimo no peso seco total devido à perda de substratos respiratórios, o que foi após o 6º dia, compensado pela fotossíntese das primeiras folhas, as quais começaram neste período a ter um rápido aumento em peso. Como foi verificado anteriormente, a perda em peso dos cotilédones foi acompanhada pelo ganho em peso pelo embrião, de tal forma que por volta do 6º dia de crescimento o cotilédone e o embrião apresentaram o mesmo peso (fig. 14a).

As raízes novamente tiveram um crescimento em peso seco menor que a parte aérea, sendo que no 9º dia de crescimento seu peso equivaleu a 45% do peso seco da parte aérea. É interessante notar que o componente de maior peso da parte aérea foram as folhas.

As mudanças do conteúdo protéico dos vários órgãos são mostrados na figura 14b. Também neste caso a perda do conteúdo protéico nos cotilédones foi acompanhada pelo ganho em proteínas pelo embrião. Neste caso parece que o processo de degradação e translocação das reservas foi mais rápido, sendo o ponto de cruzamento para as curvas de conteúdo protéico de embrião e cotilédone ao redor do 4º dia, dois dias antes daquele encontrado para translocação da matéria seca.

A distribuição de proteínas seguiu o mesmo padrão que aquele para matéria seca, só que neste caso a diferença para a distribuição de proteínas entre parte aérea e raiz foi ainda mais marcante. Assim o conteúdo protéico da raiz foi somente 20% daquele encontrado para a parte aérea no 9º dia de crescimento, e a análise do conteúdo relativo nos vários órgãos revelou 232 µg/mg de peso seco nas folhas, comparado com somente a metade do caule, ou seja, 102 µg/mg de peso seco e 82 µg/mg na raiz. Os dados indicam que houve uma defasagem entre a hidrólise de proteínas no cotilédone e reconstituição destas proteínas no embrião. Desta forma, embora 70% da proteína inicial no grão

FIGURA 14a. Mudanças no peso total (□), de plântula (○), de cotilédones (●), de parte aérea (▲), de raiz (▼) e de folha (△) durante os primeiros 9 dias de crescimento da planta de feijão. Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 14b. Mudanças no conteúdo protéico de cotilédones (●), embrião (○), raiz (▼), folha (△), caule (▲) e caule + folhas (▲) durante os primeiros 9 dias de crescimento da planta de feijão. Cada ponto representa a média de 6 valores.

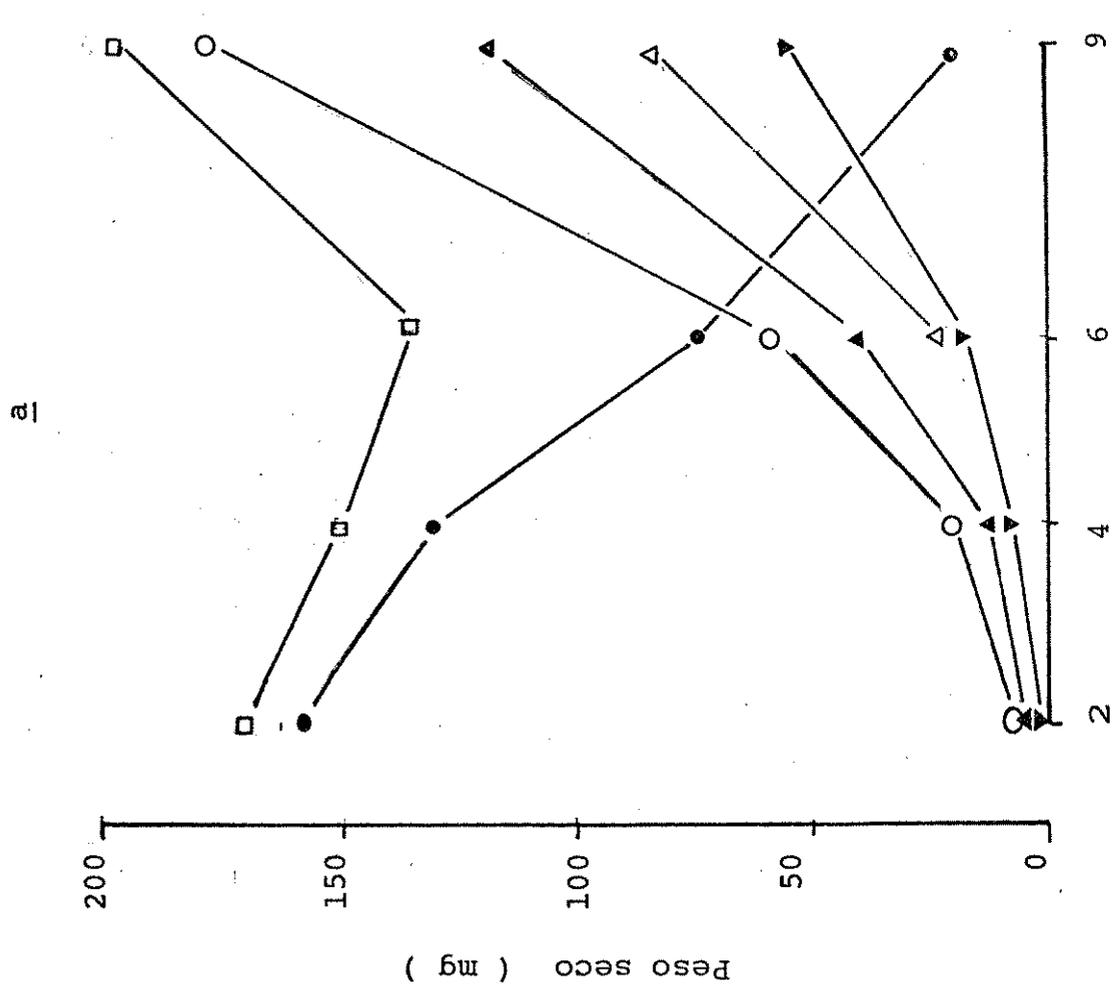
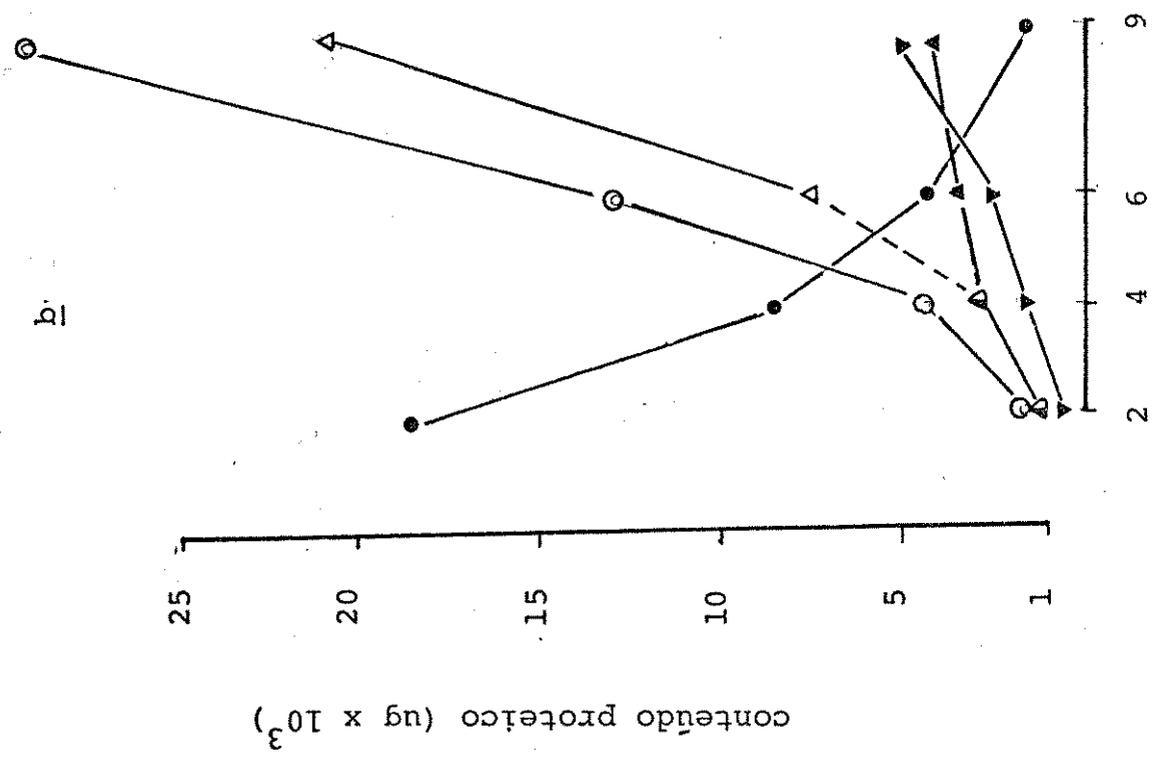


FIGURA 14

seco tenha sido hidrolizada ao redor do 4º dia, por volta do 9º dia de crescimento é que esta proteína foi detectada no embrião, sendo que a maior parte estava nas folhas.

As taxas de translocação de matéria seca e proteínas dos vários órgãos são mostrados na tabela 2.

Considerando em primeiro lugar as duas primeiras colunas, da tabela 2a, que se referem à taxa de translocação de matéria seca do cotilédone para o embrião, pode ser visto que a perda de peso seco dos cotilédones foi correlacionada com o ganho de peso seco pelo embrião nos primeiros 6 dias de crescimento e que a taxa entre os dias 2 e 4 foi menor que entre os dias 4 e 6. Após o 6º dia, embora a taxa de translocação do cotilédone tenha caído, a taxa de aumento de peso para o embrião duplicou em relação à anterior (entre os dias 4 e 6), devido tanto ao ganho de matéria seca através das reservas dos cotilédones, como através da fixação concomitante de carbono pela parte aérea.

Comparando-se a translocação de matéria seca e de proteínas do cotilédone para o embrião, verificou-se que o material protéico foi utilizado muito mais rapidamente que a matéria seca. Desta forma, entre os dias 2 e 4, teve-se maior taxa de translocação para proteínas, a qual depois desta data diminuiu continuamente (tabela 2b). Já para matéria seca a taxa maior se deu entre os dias 4 e 6, sendo muito mais lenta entre os dias 2 e 4. O conteúdo protéico no embrião foi reflexo da translocação de proteínas do cotilédone, aumentando continuamente entre os dias 2 e 9 de crescimento.

Análises mais detalhadas de raiz e parte aérea mostraram que a distribuição de matéria seca e de proteínas sempre foi maior para a parte aérea: assim, entre os dias 6 e 9, apenas 30% de matéria seca e 16% de proteínas, disponíveis para o embrião, foram para a raiz.

Em resumo estes dados estabeleceram que as reservas da semente foram utilizadas até o 8º dia de crescimento, havendo degradação mais rápida de proteínas que da matéria seca; que a parte aérea recebeu mais material de reserva que as raízes e que as folhas são os órgãos mais importantes da parte aérea na planta jovem.

TABELA 2 - Quantidade de matéria seca (2a) e de proteína (2b) translocada por dia dos cotilédones para a plântula de feijão e seus componentes: parte aérea e raiz.

Tabela 2a - Translocação de matéria seca

Dias	Perda de peso do cotilédone (mg/dia)	Ganho de peso pela plântula (mg/dia)	Ganho de peso pela raiz (mg/dia)	Ganho de peso pela parte aérea (mg/dia)
2-4	14,0	6,0	3,0	3,0
4-6	27,5	19,0	5,5	13,5
6-9	18,3	40,0	12,6	27,4

Tabela 2b - Translocação de proteína

Dias	Perda protéica do cotilédone (mg/dia)	Ganho protéico pela plântula (mg/dia)	Ganho protéico pela raiz (mg/dia)	Ganho protéico pela parte aérea (mg/dia)
2-4	5,014	1,347	0,518	0,856
4-6	2,138	4,230	0,363	3,867
6-9	1,005	5,354	0,844	4,510

3. A influência do tratamento com ácido giberélico (GA_3) e 6 benziladenina (6BA) no desenvolvimento inicial da planta de feijão

A. Efeito sobre o crescimento

Em estudos preliminares foi analisado o efeito de várias concentrações de ácido giberélico (GA_3) e 6-benziladenina (6BA) sobre a morfologia externa da planta e sobre a distribuição de matéria seca nos vários órgãos das plantas.

Os efeitos tanto de GA_3 como 6BA foram marcantes e distintos: em geral as plantas tratadas com GA_3 ficaram alongadas, apresentando um grande aumento na altura, enquanto que as tratadas com 6BA ficaram curtas, apresentando um engrossamento do caule.

O efeito de várias concentrações de GA_3 sobre a morfologia externa e distribuição de peso seco nos vários órgãos de plantas com 10 dias de idade é mostrado na figura 15. Observa-se que houve uma correlação positiva entre o aumento da concentração de GA_3 e a altura da planta (fig. 15a), sendo que plantas tratadas com 100 ppm de GA_3 mostram um aumento de 139% em altura, em relação às plantas controle. O aumento do comprimento total de plantas tratadas foi devido em maior parte ao crescimento do hipocótilo, o qual em plantas tratadas com 100 ppm apresentaram 5,5 cm a mais que os hipocótilos de plantas controle (fig. 15b). Entretanto o epicótilo (fig. 15c) foi a parte mais sensível ao tratamento com GA_3 , uma vez que em termos relativos tratamento com 100 ppm provocou um aumento de 300% no epicótilo (comparado com um aumento de 100% do hipocótilo).

A análise do comprimento da nervura principal revelou que apenas altas concentrações de GA_3 tiveram efeito, sendo que folhas de plantas tratadas com 100 ppm apresentaram uma diminuição de tamanho de 56% em relação ao controle (fig. 15d).

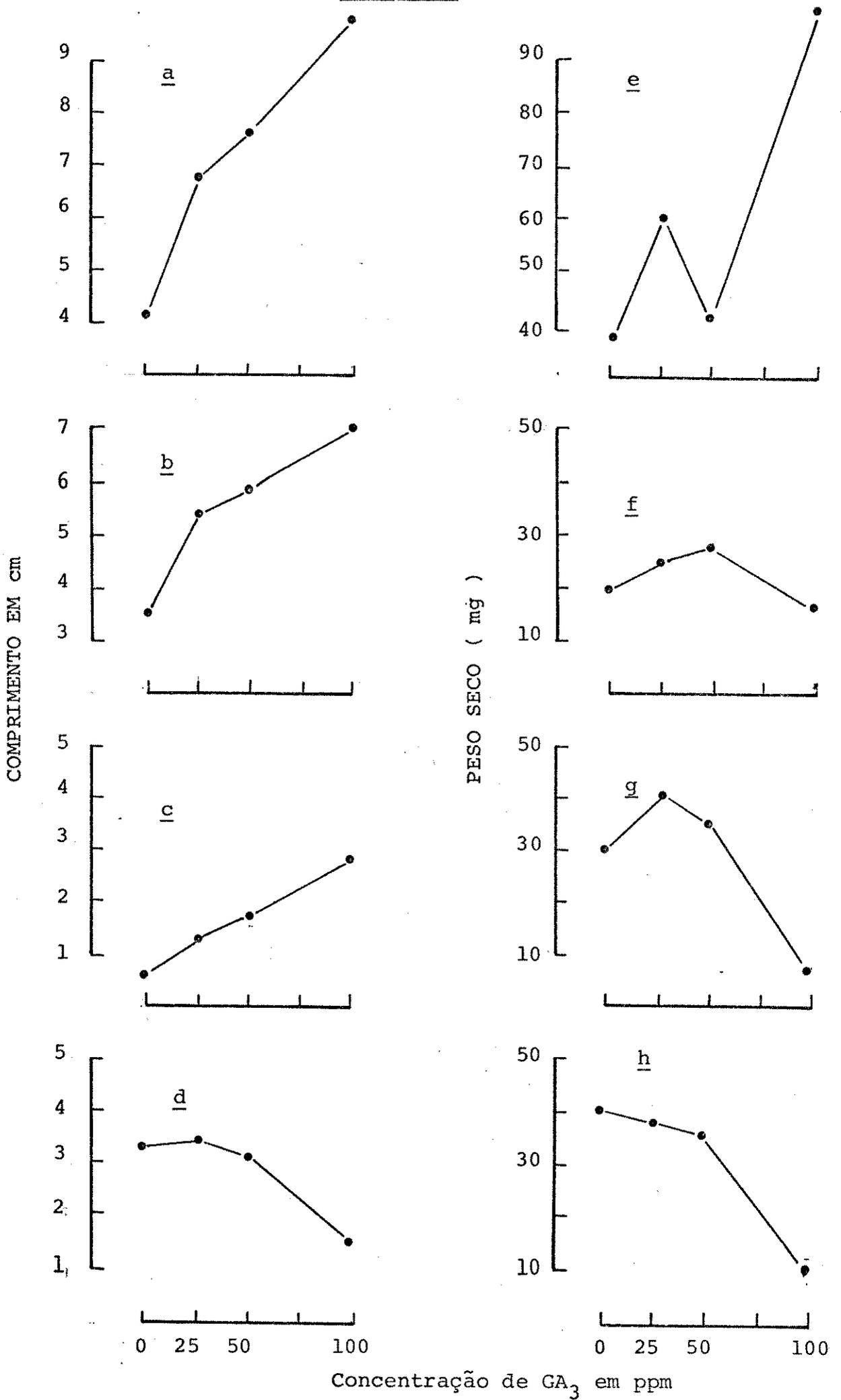
A análise de peso seco nos diversos órgãos das plantas tratadas com GA_3 é mostrada nas figuras 15e a 15h.

Os efeitos vistos para peso seco foram menores e menos nítidos que aqueles observados para a morfologia externa, tanto assim que apenas tratamentos com concentrações bem altas mostra

FIGURA 15 a-d. Altura total de plantas (a), comprimento de hipocótilo (b), epicótilo (c) e nervura principal (d) da folha primária de plantas de feijão tratadas com várias concentrações de GA_3 . Plantas com 10 dias de idade.

FIGURA 15 e-h. Peso seco de órgãos de plantas de feijão de 10 dias de idade, tratadas com várias concentrações de GA_3 : cotilédone (e), caule (f), raiz (g) e folha (h). Cada ponto representa a média de 5 valores.

FIGURA 15



ram alterações marcantes em relação ao controle. As raízes e folhas (fig. 15g e 15h) apresentaram uma diminuição no conteúdo em matéria seca nas plantas tratadas com 100 ppm. É interessante notar que nestas plantas os cotilédones (fig. 15e) apresentaram maior peso seco. Assim, parece que o efeito de GA_3 sobre a plântula e cotilédones foi diverso, sugerindo, talvez, que este hormônio interfira na utilização das reservas.

Os mesmos parâmetros analisados em plantas sob tratamento de GA_3 foram analisados sob tratamento com 6BA, num outro experimento utilizando plantas com 12 dias de idade. Os resultados são observados nas figuras 16 e 17.

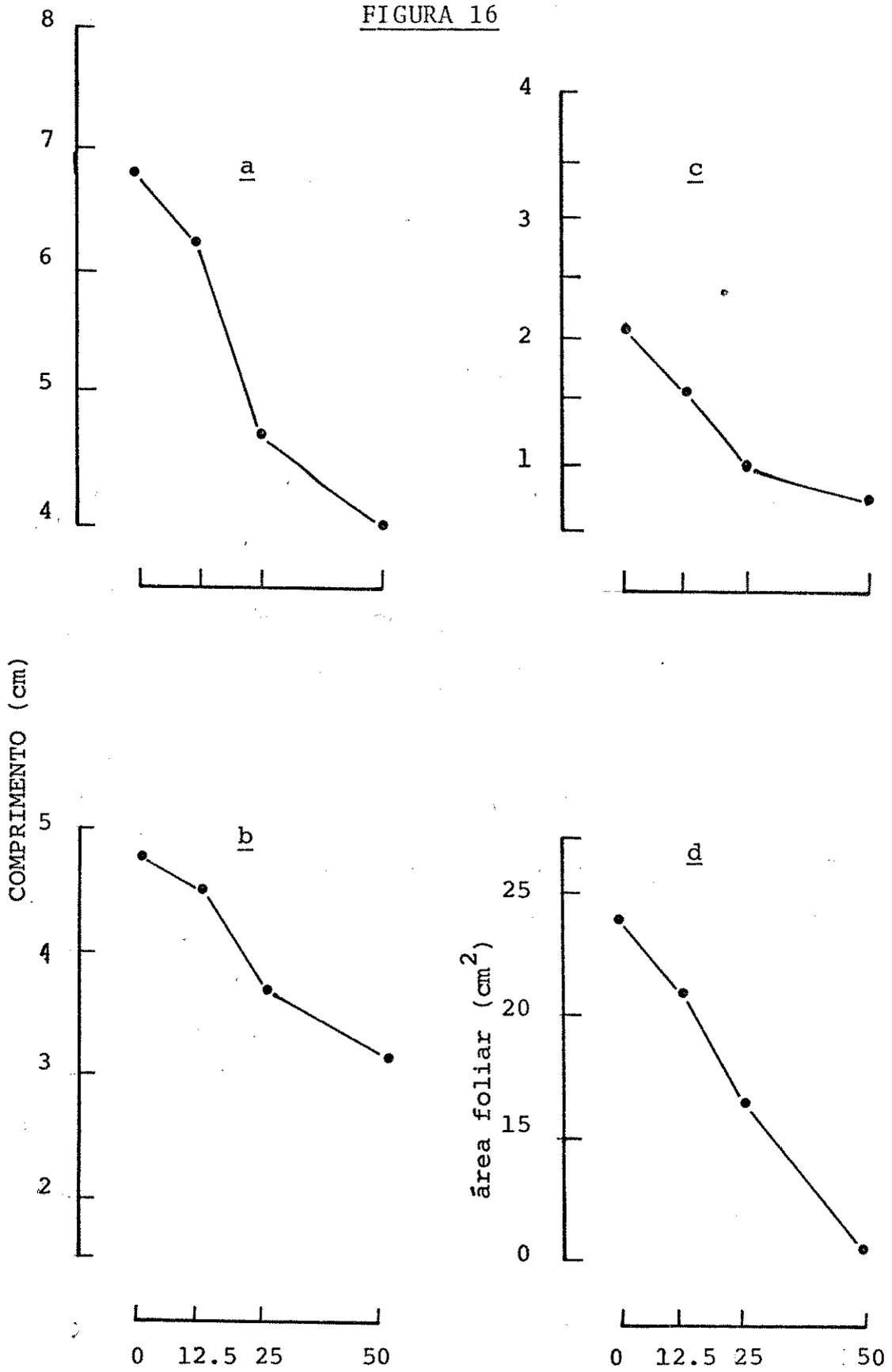
Os efeitos observados para tratamento com 6BA foram opostos àqueles observados para tratamento com GA_3 , sendo que com o aumento da concentração de 6BA houve uma diminuição na altura total da planta (fig. 16a). Plantas tratadas com 50 ppm deste regulador apresentaram comprimento total 55% menor que aquele apresentado em plantas controle. A diminuição no comprimento total foi devido à uma diminuição de 1,4 cm tanto do hipocótilo (fig. 16b) como do epicótilo (fig. 16c), embora em termos relativos o epicótilo, em plantas tratadas com 50 ppm, tenha sofrido uma diminuição de 62% em comparação à diminuição de apenas 32% do hipocótilo.

Foi observado uma correlação negativa entre o aumento das concentração de 6BA e a área da folha, sendo que em plantas tratados com 12,5; 25 e 50 ppm a área foliar foi reduzida a 89, 70 e 45%, respectivamente, em comparação a plantas controle (fig. 16d).

A análise do peso seco total, visto na figura 17a, mostrou que há uma forte correlação negativa com o aumento da concentração de 6BA: a concentração mais alta provocou uma diminuição de mais de 50% no conteúdo de matéria seca. A análise dos órgãos individualmente mostrou que o tratamento não pareceu afetar o crescimento do caule (fig. 17b), causando entretanto forte diminuição do crescimento em termos de peso seco para raízes e folhas (fig. 17c e 17d). Esta diminuição, em plantas tratadas com 50 ppm, foi relativamente maior nas raízes (70%) que nas folhas (50%) em comparação a plantas controle. Em relação aos cotilédones o efeito de 6BA foi em parte semelhantes ao observado para o tratamento de GA_3 , havendo um aumento no peso fresco dos cotilédones (fig. 17e) com o aumento da concentração

FIGURA 16. Altura total (e), comprimento do hipocótilo (b) epictótilo (c) e área foliar das primeiras folhas (d) de plantas de feijão com 12 dias de idade, tratadas com várias concentrações de 6BA. Cada ponto representa a média de 5 valores.

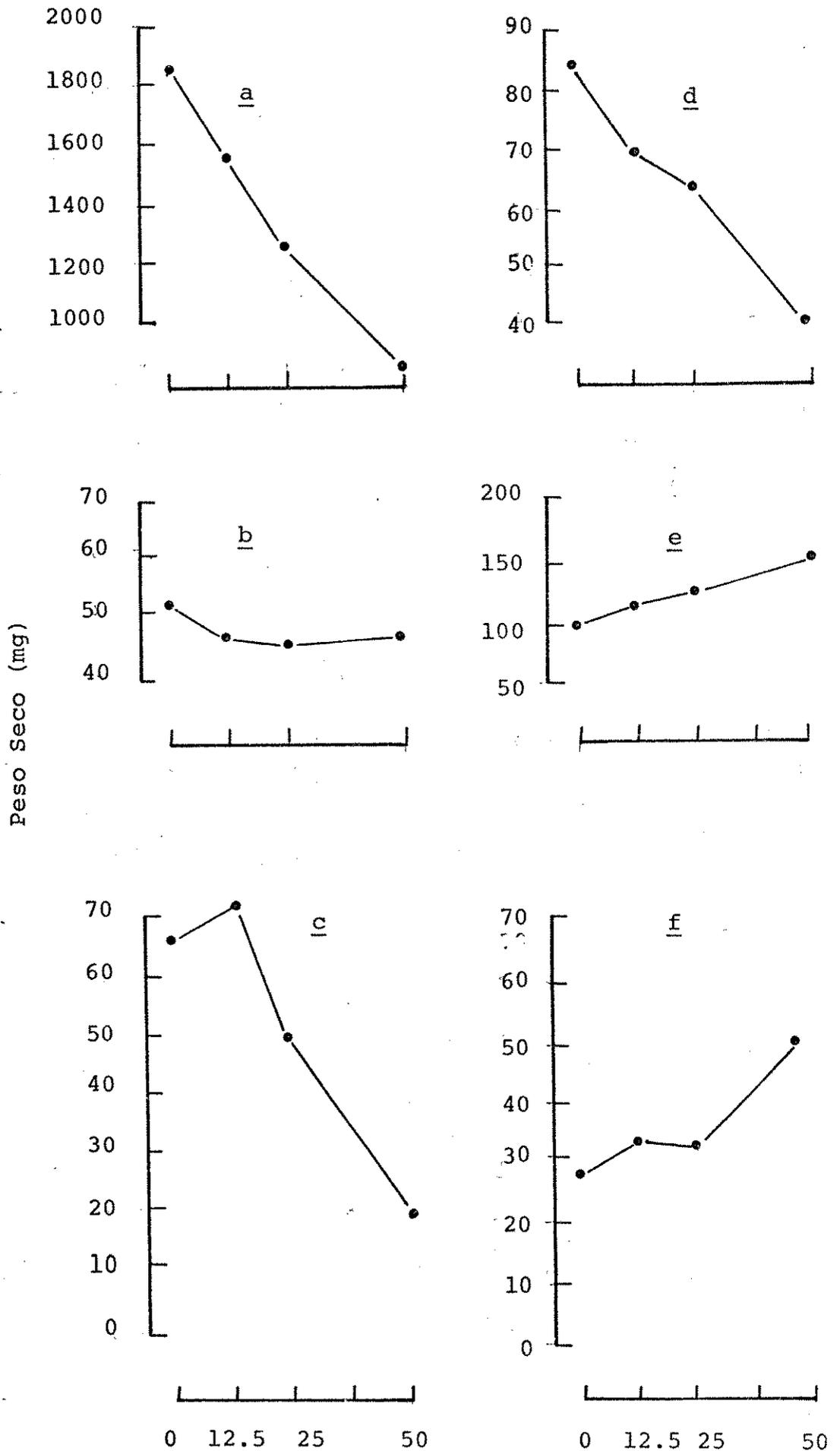
FIGURA 16



Concentração de 6 BA em ppm

FIGURA 17. Peso seco total (a), de caule (b), de raiz (c), de folhas (d) e de cotilédones (f) e peso fresco de cotilédones (e) de plantas de feijão com 12 dias de idade tratadas com várias concentrações de 6BA. Cada ponto representa a média de 5 valores.

FIGURA 17



Concentrações de 6BA (ppm)

de 6BA. A figura 17f mostra o peso seco de cotilédones de plantas tratadas com várias concentrações de 6BA em um outro experimento, já que neste experimento os cotilédones foram utilizados para dosagem de proteínas. Novamente foi verificado que houve menor utilização das reservas cotiledonares em plantas tratadas com 6BA.

Nestes dois experimentos a concentração mais alta testada para GA_3 (100 ppm) provocou efeitos drásticos nas plantas: os caules muito finos quebravam-se frequentemente por alongamento excessivo. Experimentos anteriores também mostraram que com tratamento com 6BA a 100 ppm as raízes foram fortemente diminuídas, dificultando a fixação das plantas por ocasião da emergência do gancho plumular, além de provocar o enrugamento das folhas, surgindo às vezes áreas de necrose. Por estes motivos em experimentos posteriores foram utilizadas concentrações de 50 ppm para os dois tratamentos empregados.

O dado mais interessante visto nos experimentos preliminares, para estes estudos, foi a tendência dos cotilédones de plantas tratadas em apresentar maior peso seco em relação às plantas controle, indicando que as plantas tratadas foram menos eficientes na utilização de matéria seca.

Este dado foi estudado em mais detalhe em outros experimentos.

Os dados apresentados na tabela 3 são os de vários experimentos, utilizando plantas, entre 10 e 13 dias de idade, tratadas com GA_3 ou 6BA em concentração de 50 ppm.

Os resultados confirmaram os aspectos de morfologia externa já vistos: enquanto tratamento com GA_3 provocou aumento no comprimento total da planta, o tratamento com 6BA teve efeito reverso, diminuindo a altura total das plantas em relação ao controle e sob tratamento de GA_3 , em três experimentos, houve um aumento em altura de 35 a 90% ($p < 0,001$) enquanto que sob tratamento de 6BA houve uma inibição no comprimento total de 20 a 50% ($p < 0,001$).

Analisando o efeito dos tratamentos aplicados sobre o comprimento de epicótilo e hipocótilo (tabela 3b e 3c) foi observado que o tratamento com GA_3 promoveu aumento total, através de alterações tanto no comprimento de hipocótilo como do epicótilo ($p < 0,001$); entretanto no caso de tratamento com 6BA

TABELA 3 - Medidas de comprimento total (3a), de hipocótilo (3b), de epicótilo (3c), de espessura do caule (3d) e a área foliar (3e) de plantas de feijão de 3 experimentos distintos tratadas com ácido giberélico ou benziladenina (50ppm). Os dados representam a média de 10 plantas.

++ significância a nível de 1%

+++ significância a nível de 0,1%

N.S. não significante

Tabela 3a - altura total da planta (cm)

	controle	ácido giberélico	benziladenina
Exp.1	5,9	11,2 ⁺⁺⁺	2,9 ⁺⁺⁺
Exp.2	5,5	7,3 ⁺⁺⁺	4,6 ⁺⁺⁺
Exp.3	6,4	9,3 ⁺⁺⁺	5,7 N.S.

Tabela 3b - comprimento de hipocótilo (cm)

	controle	ácido giberélico	benziladenina
Exp.1	4,5	7,4 ⁺⁺⁺	2,4 ⁺⁺⁺
Exp.2	3,8	4,9 ⁺⁺⁺	2,7 ⁺⁺⁺
Exp.3	4,5	6,7 ⁺⁺⁺	4,2 N.S.

Tabela 3c - comprimento de epicótilo (cm)

	controle	ácido giberélico	benziladenina
Exp.1	1,4	3,8 ⁺⁺⁺	0,5 ⁺⁺⁺
Exp.2	1,7	2,4 ⁺⁺⁺	0,9 ⁺⁺⁺
Exp.3	1,9	2,6 ⁺⁺⁺	1,5 ⁺⁺⁺

Tabela 3d - espessura do caule

	controle	ácido giberélico	benziladenina
Exp.1	3,07	2,70 ⁺⁺⁺	3,83 ⁺⁺⁺

Tabela 3e - área foliar (cm²)

	controle	ácido giberélico	benziladenina
Exp.1	27,2	24,4 N.S.	14,9 ⁺⁺⁺
Exp.2	19,2	15,0 ⁺⁺	13,2 ⁺⁺⁺
Exp.3	16,5	13,0 ⁺⁺	5,0 ⁺⁺⁺

parece que a diminuição no comprimento total foi devida mais a uma diminuição do epicótilo que no hipocótilo ($p < 0,001$). Além das alterações em comprimento total, os tratamentos promoveram modificações na espessura do caule, sendo que sob tratamento de GA_3 houve uma diminuição de 12% na espessura ($p < 0,001$) e sob tratamento de 6BA, ao contrário, houve um aumento de 30% na espessura do caule em relação ao controle ($p < 0,001$) (tabela 3d).

Ambos os tratamentos diminuíram a área foliar, sendo esta diminuição mais acentuada sob tratamento de 6BA. Tratamento de GA_3 provocou uma diminuição de 20% na área foliar ($p < 0,011$), enquanto que o tratamento de 6BA provocou diminuição entre 30 e 70% ($p < 0,001$) (tab. 3e).

Os dados para pesos fresco e seco de raiz, folhas e cotilédones destas plantas são mostrados nas tabelas 4 e 5. No caso do caule, os dois tratamentos aplicados não promoveram alterações significativas com relação ao peso quando comparados com o controle, como visto anteriormente (fig. 15f e 17b).

Analisando-se os dados para peso fresco observa-se que o tratamento de GA_3 parece ter afetado, dentre os vários órgãos, apenas as folhas, as quais tiveram uma diminuição em peso de 22 a 50% em relação ao controle ($p < 0,001$). O tratamento de 6BA ao contrário, provocou alterações altamente significativas no peso fresco de folhas, raízes e cotilédones ($p < 0,001$).

Em folhas e raízes houve uma redução no peso respectivamente de 50% e 65%, enquanto que nos cotilédones o efeito foi o de aumento de peso. Este dado para cotilédones veio a confirmar a proposição anterior que sob tratamento de 6BA os cotilédones perdiam peso mais lentamente que os cotilédones de plantas controle, tanto assim, que o peso fresco dos cotilédones tratados foi 70% maior que o de cotilédones de plantas controle ($p < 0,001$).

A tabela 5 mostra a distribuição de peso seco de raízes, folhas e cotilédones de plantas sob tratamento com GA_3 ou 6BA. A análise dos dados mostrou que as alterações de peso seco foram reflexo daquelas vistas para peso fresco, podendo desta forma serem os dois parâmetros medidas válidas para o estudo dos tratamentos aplicados. No caso de GA_3 novamente apenas a folha foi afetada ($p < 0,01$), a qual teve uma diminuição de cerca de 40% em relação às folhas de plantas controle.

Tabela 4 - Medidas de peso fresco (mg) de folha, raiz, e cotilédones de plantas de feijão de 4 experimentos independentes, tratadas com ácido giberélico ou benziladenina (50ppm). Os dados representam a média de 10 plantas.

N.S. não significante

++ significância a nível de 1%

+++ significância a nível de 0,1%

	controle	ácido giberélico	benziladenina
Folha			
Exp.1	603	473 ⁺⁺⁺	214 ⁺⁺⁺
Exp.2	732	573 ⁺⁺⁺	511 ⁺⁺⁺
Exp.3	546	250 ⁺⁺⁺	326 ⁺⁺⁺
Exp.4	947	-	511 ⁺⁺⁺
Raiz			
Exp.1	986	921 N.S.	110 ⁺⁺⁺
Exp.2	1259	1166 N.S.	435 ⁺⁺⁺
Exp.3	690	553 N.S.	328 ⁺⁺⁺
Exp.4	799	-	414 ⁺⁺⁺
Cotilédone			
Exp.1	141	154 N.S.	284 ⁺⁺⁺
Exp.2	91	97 N.S.	144 ⁺⁺⁺
Exp.3	109	113 N.S.	153 ⁺⁺⁺
Exp.4	124	-	220 ⁺⁺⁺

TABELA 5 - Medidas de peso seco (mg) de folha, raiz e cotilédones de plantas de feijão de 3 experimentos independentes, tratadas com ácido giberélico ou benziladenina (50ppm).

+ significância ao nível de 5%

++ significância ao nível de 1%

+++ significância ao nível de 0,1%

N.S. não significante

	controle	ácido giberélico	benziladenina
Folha			
Exp.1	88,2	65,3 ⁺⁺	33,6 ⁺⁺⁺
Exp.2	87,4	44,0 ⁺⁺⁺	55,6 ⁺⁺⁺
Exp.3	-	-	-
Raiz			
Exp.1	72,8	69,7 N.S.	12,0 ⁺⁺⁺
Exp.2	54,2	47,3 N.S.	21,2 ⁺⁺⁺
Exp.3	51,9	-	31,6 ⁺
Cotilédone			
Exp.1	26,6	27,1 N.S.	68,1 ⁺⁺⁺
Exp.2	19,5	21,5 N.S.	29,5 ⁺⁺⁺
Exp.3	22,6	-	45,8 ⁺⁺⁺

Sob tratamento de 6BA as folhas e raízes tiveram seu peso diminuído, sendo, novamente, o efeito sobre as raízes mais acentuado que sobre as folhas.

Em cotilédones, o efeito de tratamento de 6BA sobre peso seco foi mais marcante que sobre o peso fresco, tendo estes cotilédones um aumento em peso seco de mais de 100% em relação ao controle. Isto talvez tenha ocorrido uma vez que, tendo-se como parâmetro o peso fresco, a expansão das células hidratadas pode ter mascarado o efeito de 6BA em cotilédones.

Em resumo, os dados destas duas tabelas estabelecem que com tratamento de GA_3 apenas as folhas foram afetadas, tendo seu peso diminuído; enquanto que sob tratamento de 6BA tanto folhas e raízes como cotilédones sofreram alterações, tendo os dois primeiros órgãos sofrido uma redução em peso, contra um aumento de peso apresentando pelos cotilédones em relação às plantas controle.

Uma vez verificado o efeito tanto de GA_3 como de 6BA sobre a distribuição de matéria seca, passou-se a analisar efeito destes tratamentos também sobre a distribuição de proteínas nos diversos órgãos das plantas.

Os dados de distribuição do conteúdo protéico de folhas, raízes e cotilédones destes experimentos são vistos na tabela 6. Os dados para o caule não foram significativamente diferentes, sob estes dois tratamentos, em relação ao controle.

Sob tratamento de GA_3 nenhum dos órgãos apresentou modificações no conteúdo protéico em dois experimentos (tab. 6a e 6b), em relação ao controle. Entretanto, sob tratamento de 6BA o conteúdo protéico de cada órgão sofreu nítidas mudanças em relação ao controle ($p < 0,001$). As folhas, por exemplo, tiveram seu conteúdo protéico diminuído em 55%, e as raízes em 60% (tab. 6a). Como visto anteriormente para peso seco, o tratamento de 6BA também retardou a degradação de proteínas de reserva, assim as plantas no 10º dia de crescimento, quando as reservas protéicas em cotilédones de plantas controle estão no final, o conteúdo em proteínas em cotilédones tratados é três vezes maior (tab. 6a). Estes resultados para cotilédones foram novamente confirmados em um outro experimento (tab. 6b), onde plantas com 12 dias de idade, tratadas com 6BA, mostraram mais proteínas nos cotilédones que as plantas controle.

TABELA 6 - Conteúdo protéico (μg) em folhas, raízes e cotilédones de plantas de feijão com 10 dias de idade (6a) ou de cotilédones de plantas com 12 dias de idade (6b), concentração de proteína em plantas com 10 dias de idade (6c) e concentração de clorofila em plantas com 12 dias de idade (6d).

Os dados representam a média de 10 plantas

+ significância a nível de 5%

++ significância a nível de 1%

+++ significância a nível de 0,1%

N.S. não significante

Tabela 6a - conteúdo protéico em raiz, folhas e cotilédones

	controle	ácido giberélico	benziladenina
folha	17265	14760 N.S.	7761 ⁺⁺⁺
raiz	4744	5932 N.S.	1808 ⁺⁺⁺
cotilédone	938	1071 N.S.	3023 ⁺⁺⁺

Tabela 6b - conteúdo protéico em cotilédones

	controle	ácido giberélico	benziladenina
cotilédone	505	400 N.S.	1144 ⁺⁺

Embora a quantidade de proteína nas folhas tenha diminuído sob os dois tratamentos, os efeitos concomitantes de redução de peso fresco e a área foliar provocaram um aumento na concentração de proteínas neste tecido (tab. 6c). Folhas tratadas com 6BA mostram 6,4 μg a mais por mg de tecido fresco e as tratadas com GA_3 8,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso fresco. Entretanto, quando a concentração de proteínas foi expressa em termos de $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de área, apenas tratamento de 6BA mostrou efeito significativo, uma vez que a redução em área sob tratamento de GA não foi marcante como em termos de peso fresco.

Foi notado, tanto em plantas inteiras como em cotilédones destacados (experimentos relatados posteriormente), que sob tratamento de 6BA o tecido é de um verde mais intenso que o de plantas controle, sugerindo influência de 6BA na concentração de clorofila destes tecidos.

Isto foi comprovado num experimento cujos dados são apresentados na tabela 6d. Novamente tanto peso fresco como área foliar foram reduzidos sob tratamentos de 6BA ($p < 0,001$). Observa-se também que em folhas de plantas tratadas com 6BA o conteúdo de clorofila foi 54% maior que o de folhas de plantas controle. Com o efeito concomitante de redução de peso fresco e área foliar sob este tratamento, a alteração na concentração de clorofila na folha das plantas tratadas foi ainda mais acentuada, havendo um aumento de cerca de 300% em relação às plantas controle.

4. Influência do tratamento de ácido giberélico (GA_3) e benziladenina (6-BA) sobre a atividade de amilases e proteases.

Uma vez visto nos experimentos de crescimento que o tratamento de benziladenina poderia influenciar a distribuição de matéria seca e protéica na planta, passou-se a analisar o efeito deste tratamento sobre a atividade de amilases e proteases, enzimas estas responsáveis pela degradação das principais reservas da semente.

Apesar do tratamento de ácido giberélico não ter mostrado diferenças significativas na distribuição de reservas, também estudou-se a possível influência deste hormônio sobre a ati

Tabela 6c - concentração de proteína na folha

	controle	ácido giberélico	benziladenina
P.F. (mg)	760,0	470,0 ⁺⁺⁺	267,0 ⁺⁺⁺
Área (cm ²)	18,5	11,9 ⁺⁺⁺	5,4 ⁺⁺⁺
µg/mgP.F.	22,7	31,4 ⁺⁺	29,1 ⁺⁺
µg/cm ²	933,0	1240,0 N.S.	1437,0 ⁺⁺

Tabela 6d - concentração de clorofila na folha

	controle	benziladenina
P.F. (mg)	947,00	511,0 ⁺⁺⁺⁺
Área (cm ²)	27,20	14,5 ⁺⁺⁺
conteúdo de clorofila (µg)	330,00	508,0 ⁺⁺⁺
µg/mg P.F.	0,35	1,1 ⁺⁺⁺
µg/cm ²	12,10	37,9 ⁺⁺⁺

vidade enzimática, uma vez que esta análise poderia revelar efeitos menores, não detectáveis através da determinação do conteúdo em matéria seca e protéica nos vários órgãos da planta.

Para a análise da atividade enzimática de amilases e proteases em cotilédones de sementes germinadas de feijão foi necessário estabelecer, em experimentos preliminares, os seguintes pontos: escolha de um substrato adequado; determinação do período de atividade enzimática do extrato; determinação do pH ótimo para esta atividade; determinação do período de linearidade da reação, sem haver limitação pelo substrato escolhido, e de terminação da temperatura adequada para a atividade enzimática.

4a₁. Dosagem da atividade de amilases

Depois de vários testes preliminares o substrato mais satisfatório foi fécula de mandioca e amido de milho, uma vez que este material teve baixo teor de maltose endógena na farinha, tendo uma absorbância mínima nos controles (brancos) da reação. Outros amidos testados (MERCK e CARLO ERBA), embora satisfatórios, apresentavam maior absorbância nos controles, indicando já a presença de pequenas quantidades de maltose.

As figuras 18a - 18c mostram que a produção de maltose durante a reação foi linear com o tempo, durante 20 minutos, quando então houve decréscimo na taxa de liberação de maltose com o tempo. A maltose produzida veio da degradação do substrato amido, pelas enzimas do extrato, como pode ser observado pela figura 18a, onde são mostrados os dados de produção de maltose tanto na ausência de extrato como na de substrato. Observa-se que na ausência de extrato o teor de maltose dado pela absorbância a 535 nm foi extremamente baixo, comprovando a baixa quantidade de maltose no substrato. Na ausência de substrato a pouca cor produzida foi devido à presença de pequena quantidade de maltose no extrato de cotilédones de feijão. Nota-se também que não houve alteração na quantidade de maltose com o tempo, significando que não houve auto-hidrólise da amostra. Extratos fervidos não mostraram nenhuma atividade amilolítica.

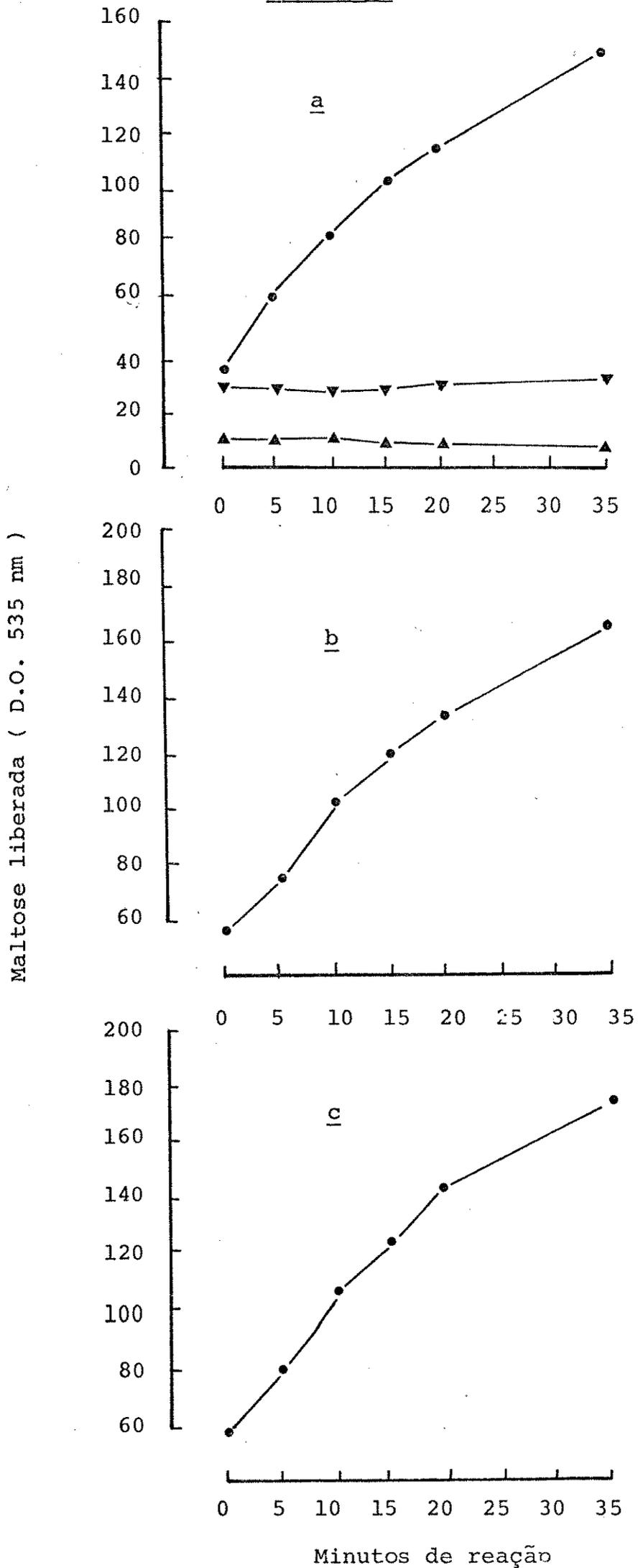
Foram testados vários volumes de extrato para 1 ml de

FIGURA 18a. Atividade amilolítica a 30°C de extratos de cotilédones feijão, medida através de produção de maltose com o tempo, utilizando amido como substrato (•).

(▲) maltose produzida na ausência de substrato
(▼) maltose produzida na ausência de extratos.

FIGURA 18b-c Atividade amilolítica em pH 5,7 (b) e atividade amilolítica em pH 7,3 (c) de extratos de cotilédones de feijão.

FIGURA 18



substrato, durante 7 minutos de reação. Os dados são mostrados na figura 19a, onde observa-se que a quantidade de maltose produzida durante a reação foi diretamente proporcional ao volume de extrato utilizado até 0,7 ml, acima do qual o substrato começou a ser limitante. Assim, em experimentos futuros foi escolhido o volume de 0,5 ml de extrato, o qual mostrou uma boa atividade enzimática.

Observa-se pela figura 19b que a atividade amilolítica dos extratos foi mantida sem perdas por um período de pelo menos três horas após a maceração do tecido. Nos experimentos posteriores o extrato foi utilizado dentro de um prazo máximo de 30 minutos após a maceração, sendo portanto eliminada a possibilidade de perda de atividade do extrato.

Várias temperaturas foram testadas para a reação da amilase (fig. 19c). Foi observado que, nas temperaturas analisadas, a liberação de maltose foi proporcional ao aumento de temperatura, sendo necessário um aumento de 25°C para dobrar a quantidade de maltose liberada. Para experimentos futuros foi escolhida a temperatura de 30°C, uma vez que a atividade de amilase foi bastante alta, além de que esta temperatura estava mais próxima das condições ambientais em que as plantas de feijão foram crescidas.

Para verificar o efeito do pH na atividade de amilases o substrato foi preparado em tampão fosfato de potássio em vários pHs. Os dados são apresentados na figura 20. Observa-se que a produção de maltose foi linear com o tempo durante os primeiros 15 minutos de reação em todos os pHs testados. Observa-se também que o controle sem extrato não liberou maltose com o decorrer da experimentação (fig. 20J. Em pHs mais ácidos (fig. 20a - b), pelo fato da reação ser muito mais lenta, a produção de maltose continuou linear até o final da experimentação, enquanto em outros pHs a linearidade foi interrompida, provavelmente por falta de substrato.

Colocando-se os dados de maltose liberada em 5 minutos de reação contra o pH (fig. 21a) observou-se maior atividade enzimática entre pH 4,5 e 6,5, contando-se como irregular a atividade encontrada em pH 7,7. Aumentando-se a variação de pH entre 4,0 e 8,0 em um segundo experimento, verificou-se que o pH ótimo para a reação está entre 5,0 e 6,0 (fig. 21b), tendo sido escolhido para experimentos futuros o pH 5,5.

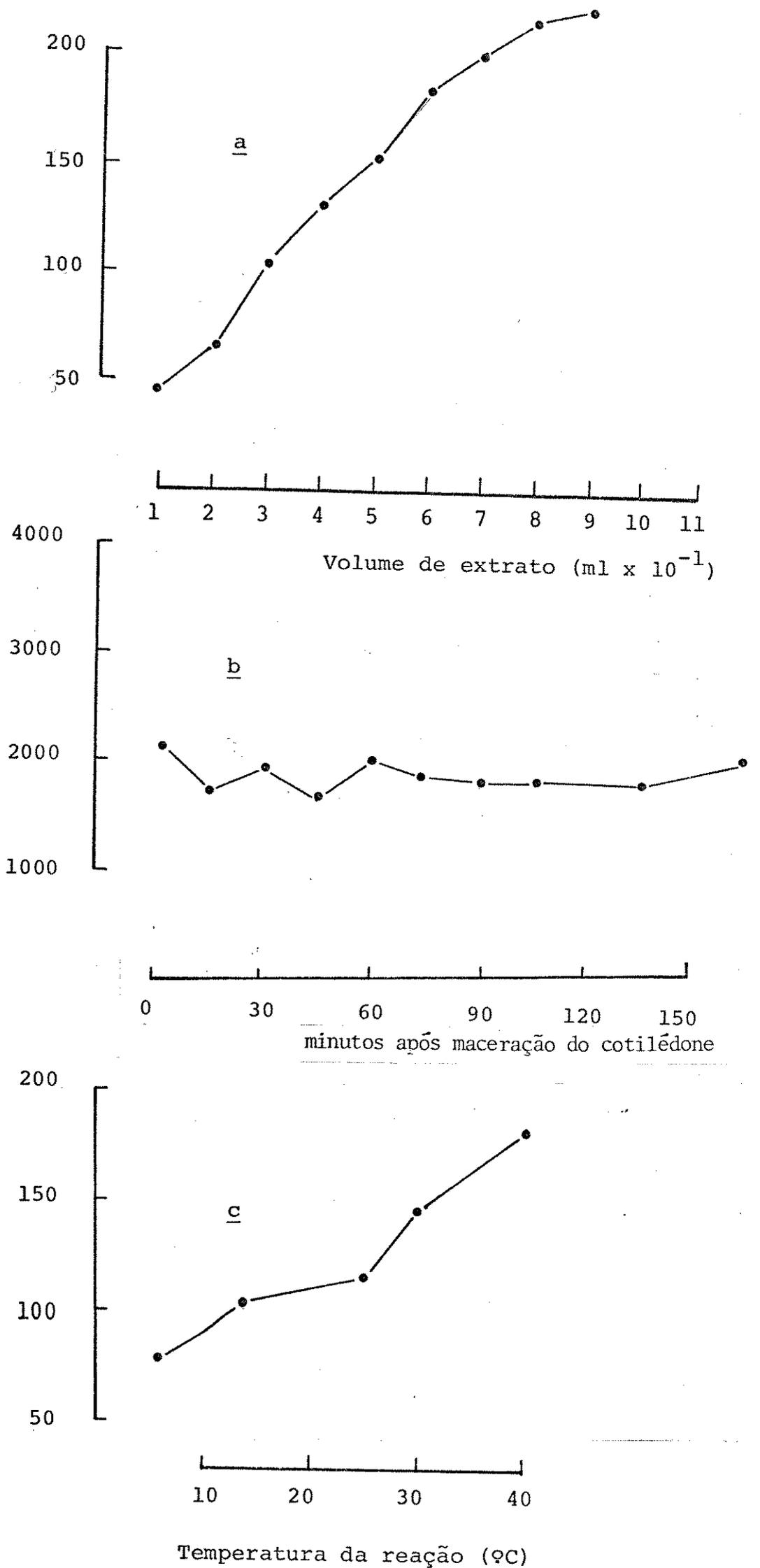
FIGURA 19a. Efeito do volume de extrato de cotilédones de feijão na produção de maltose durante 7 minutos de reação.

FIGURA 19b. Viabilidade da atividade amilolítica do extrato de cotilédones de feijão medida através de maltose produzida após 7 minutos de reação.

FIGURA 19c. Efeito da temperatura na atividade amilolítica de extratos de cotilédones de feijão após 7 minutos de reação.

FIGURA 19

Maltose liberada (D.O. 535 nm)



Temperatura da reação (°C)

FIGURA 20. Efeito do pH na produção de maltose por extrato de cotilédones de feijão durante 20 minutos de reação (a-i), ou na ausência de extrato (j).

FIGURA 20

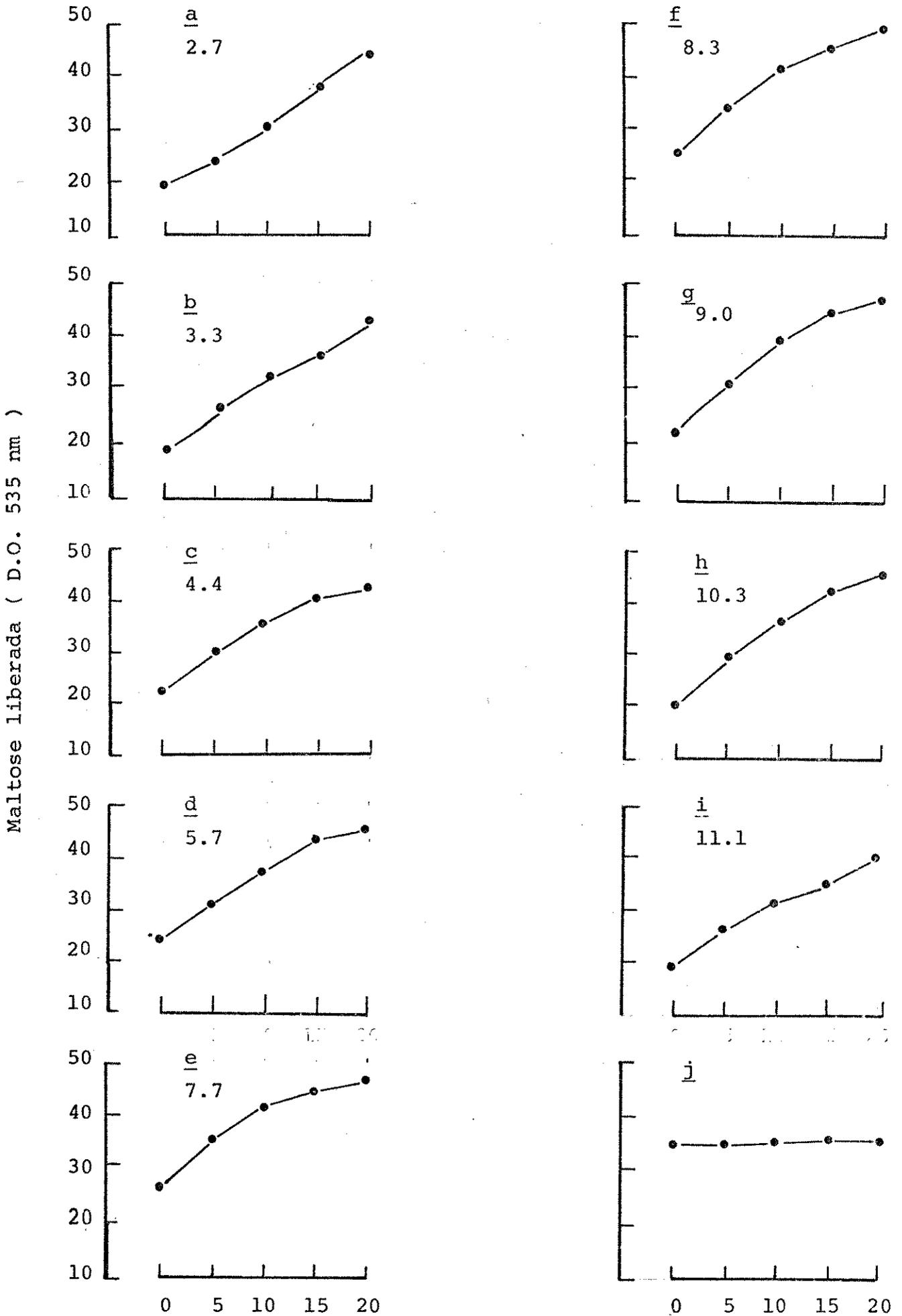
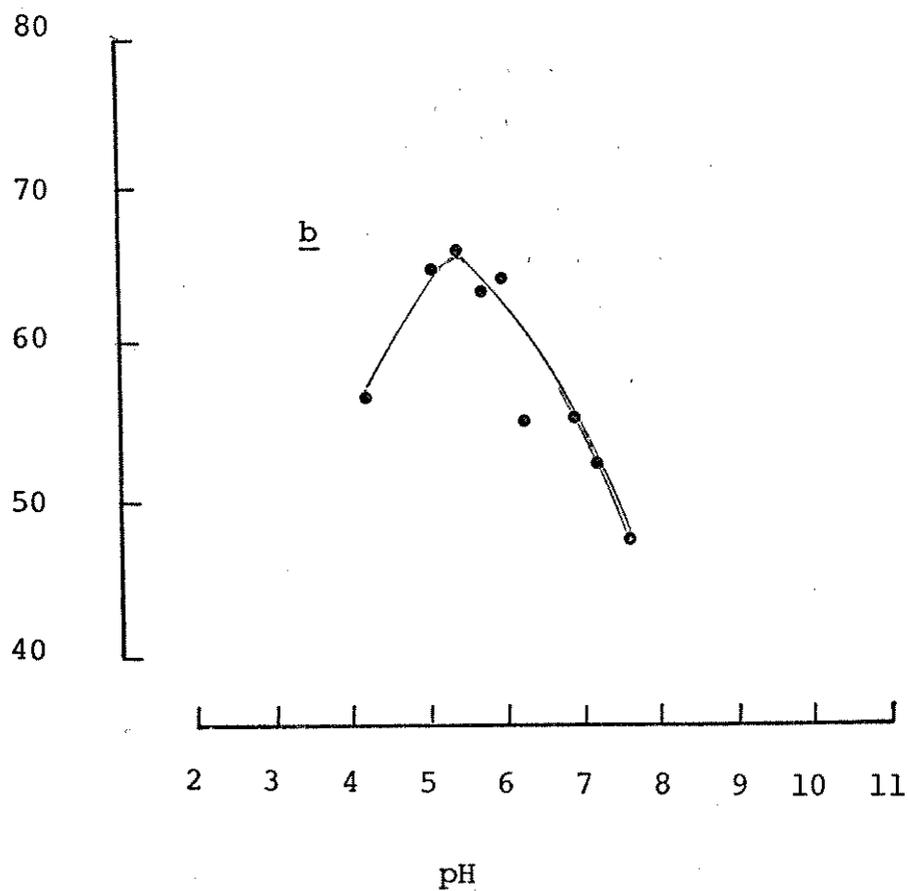
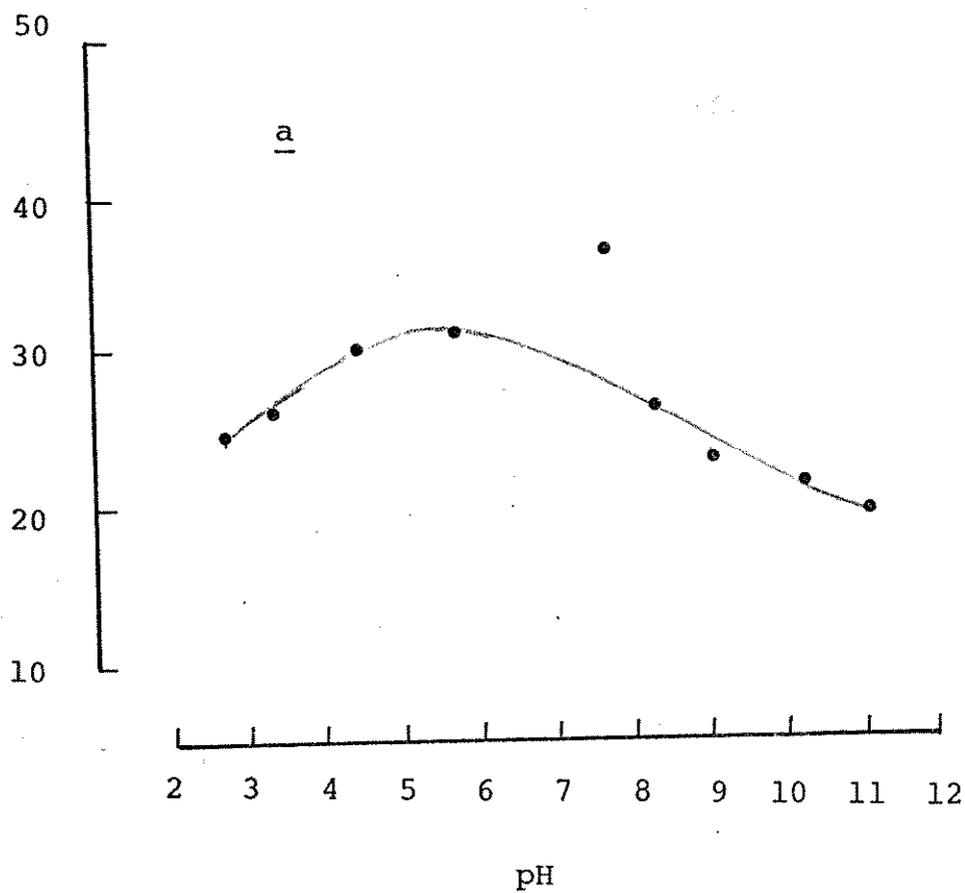


FIGURA 21. Efeito do pH na atividade amilolítica de extratos de cotilédones de feijão, medida através de produção de maltose, durante 5 minutos de reação.

FIGURA 21

Maltose liberada (D.O. 535 nm)



4a₂. Dosagem da atividade de proteases

No caso de atividade proteolítica foram testados dois substratos, hemoglobina de boi e caseína, em vários pHs, cujos dados são mostrados na figura 22.

A caseína, sendo pouco solúvel em pH ácido, foi testada entre pH 5,0 e 8,0 (fig. 22a). A hemoglobina foi testada entre pH 2,0 e 10,0 (fig. 22b). Em ambos os casos a maior atividade foi observada em pH ácido, sendo menor a atividade acima de pH 7,0. Os valores de atividade proteolítica onde a reação foi parada imediatamente (T_0) (fig. 22b) mostram que os extratos de cotilédones tinham pouco aminoácido livre em relação àqueles produzidos pela ação proteolítica durante a reação. No caso de caseína, pode ser notado pela figura 22a, que os produtos liberados em 4 horas de reação foram maiores que os liberados em duas horas, particularmente nos pHs mais baixos. A maior atividade encontrada para os dois substratos foi para caseína em pH 5,5 e para hemoglobina em pH 2,7. Como este pH para caseína coincidiu com aquele para a atividade amilolítica, decidiu-se utilizar este sistema, uma vez que o mesmo extrato poderia ser utilizado para a análise de amilase e protease. Nota-se, também, na figura 22c que a liberação de aminoácidos, durante quatro horas, foi proporcional ao volume de extrato, sendo linear entre 0,1 e 0,7 ml. Assim em experimentos futuros utilizaram-se alíquotas de volume entre 0,3 e 0,5 ml.

Num segundo experimento utilizando somente caseína foi visto que, embora a reação seja mais lenta que a de amilases, houve linearidade durante o tempo da reação analisado (fig. 23a-b). Novamente a atividade máxima, utilizando-se caseína como substrato, foi ao redor de pH 5,5, confirmando os dados já encontrados. Pela figura 23c nota-se que a atividade proteolítica foi duas vezes maior que aquela observada em pH básico e que os produtos formados após duas horas e meia de reação foram somente 80% do valor obtido após 4 horas de reação. Também foram testadas várias temperaturas entre 10 e 40°C, sendo a atividade proteolítica linear com o aumento de temperatura, havendo maior liberação de aminoácidos livres à temperatura de 40°C, sendo portanto esta temperatura utilizada nos experimentos futuros.

FIGURA 22. Efeito do pH na atividade proteolítica de extratos de cotilédones de feijão, medida através da liberação de aminoácidos livres, utilizando-se caseína (fig. 22a) ou hemoglobina (fig. 22b) como substrato. Cada ponto representa a média de 3 valores.

- (▲) atividade enzimática após 4hs (fig 22a e 22b)
- (●) atividade enzimática após 2hs (fig 22a)
- (○) tempo zero de reação (To) (fig 22b)

FIGURA 22c. Efeito do volume de extrato de cotilédones de feijão na atividade proteolítica após 4hs de reação.

FIGURA 22

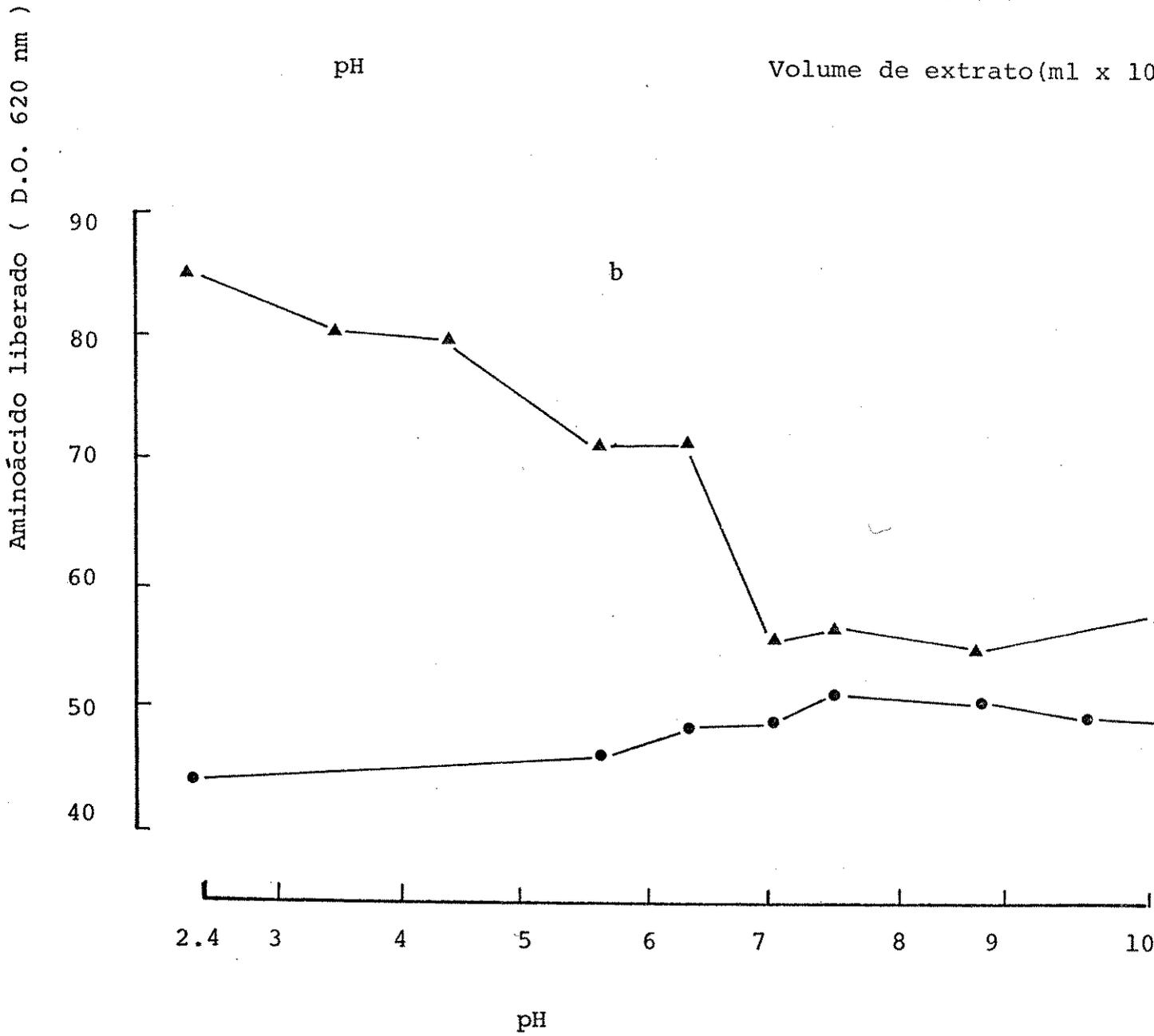
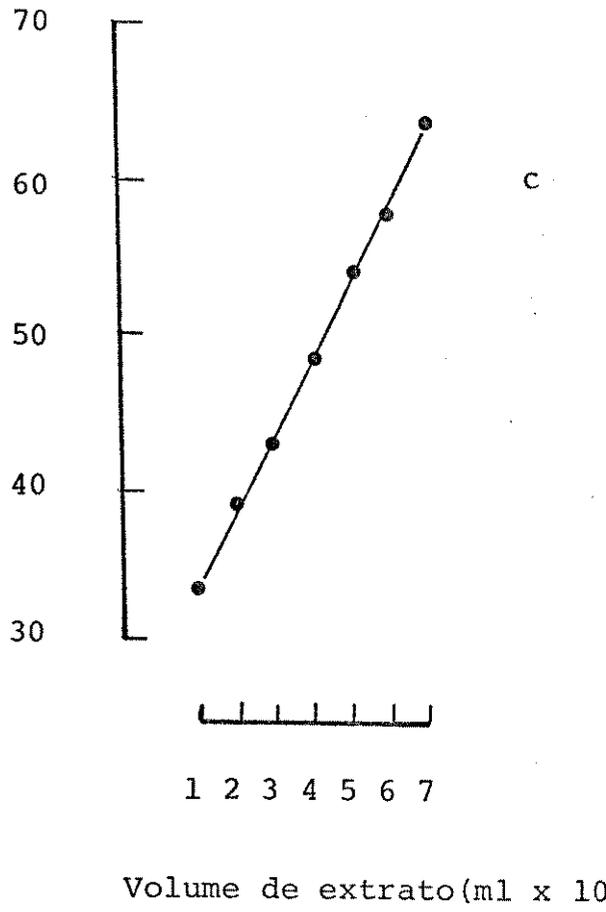
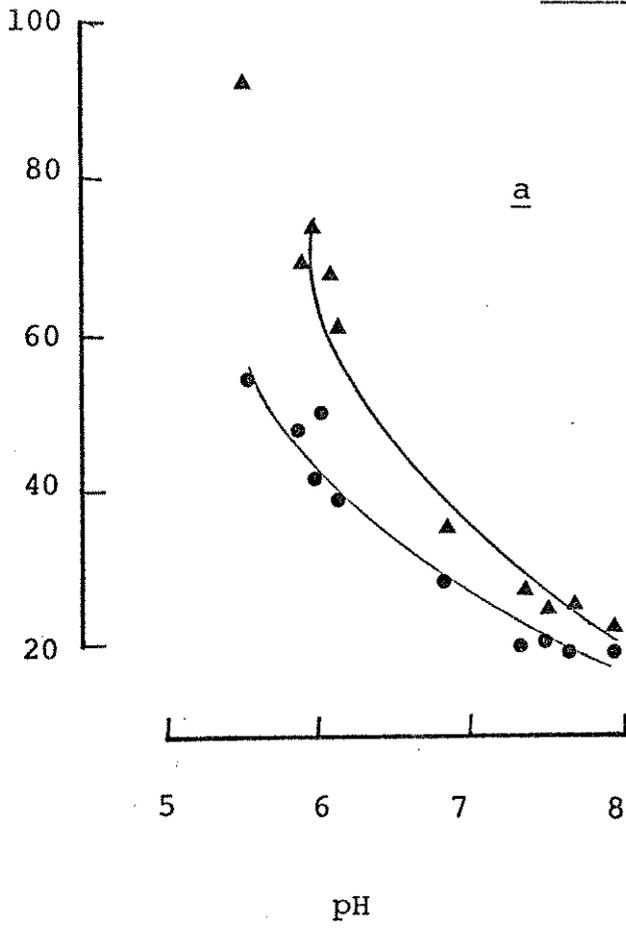
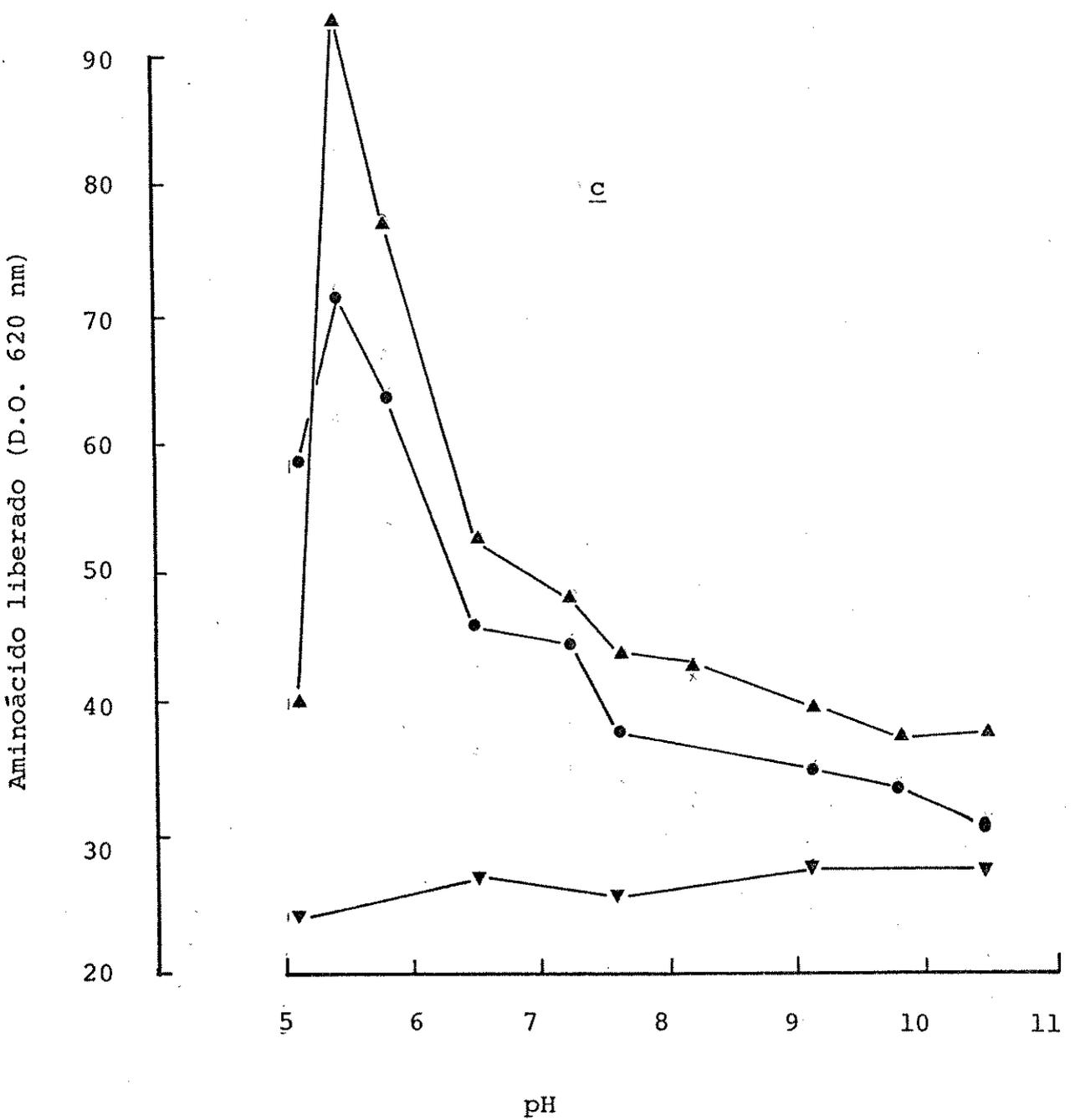
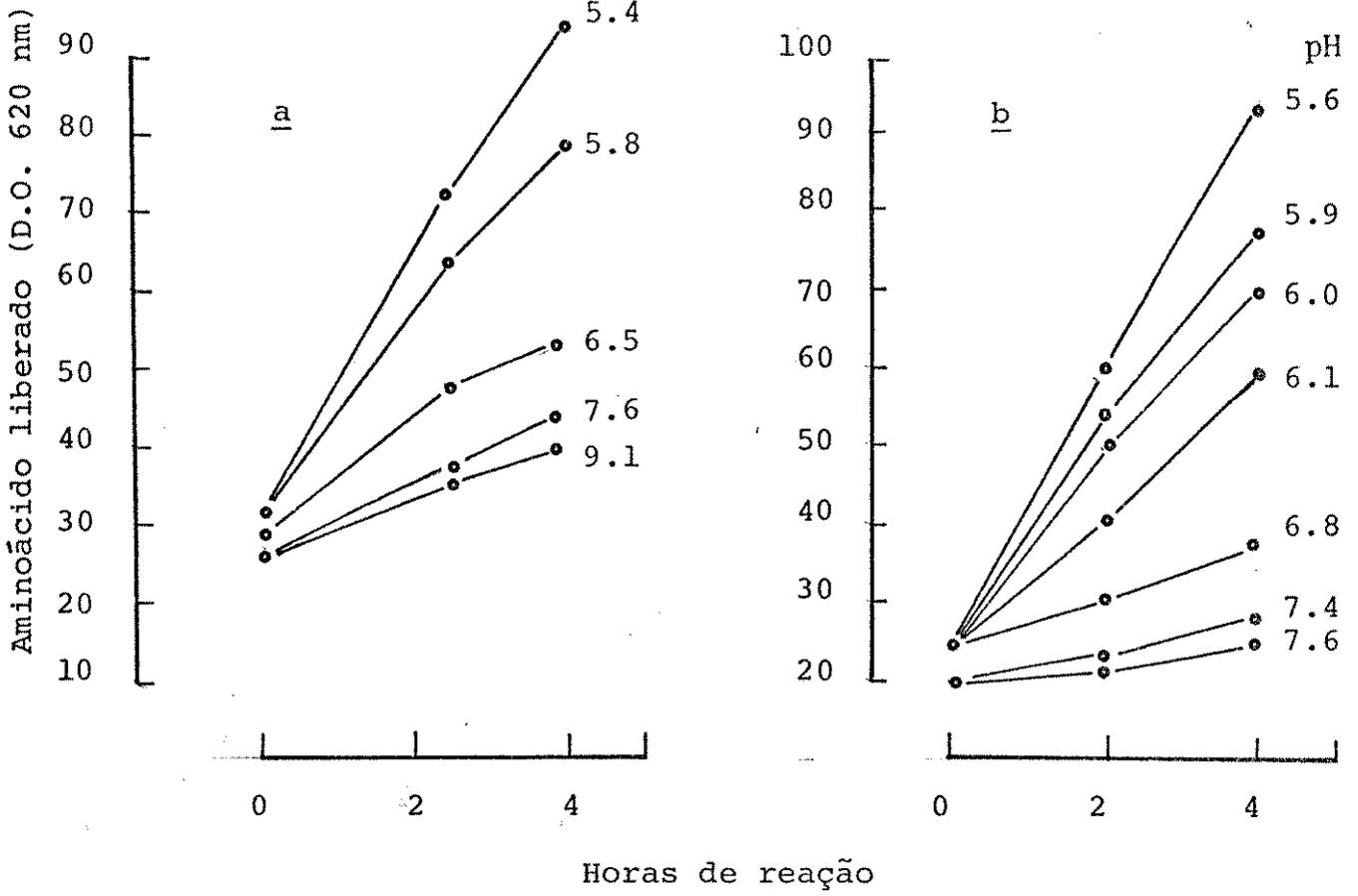


FIGURA 23a e 23b. Efeito do pH na atividade proteolítica de extratos de cotilédones de feijão até 4hs de reação, utilizando caseína como substrato. Cada figura representa um experimento.

FIGURA 23c. Mudanças na atividade proteolítica de extratos de cotilédones de feijão após 2:30h de reação (●) e 4:00h de reação (▲), utilizando caseína em pH entre 5,0 e 11,0. (▼) controle, ou seja, reação proteolítica parada imediatamente.

FIGURA 23



De posse dos dados obtidos nos experimentos preliminares passou-se a analisar o efeito de tratamento de ácido giberélico e benziladenina sobre a atividade enzimática em cotilédones de feijão em vários estágios de desenvolvimento, tanto na presença como na ausência de embrião.

Em um primeiro experimento foi analisada a atividade amilolítica em cotilédones com e sem embrião de 2, 5, 7 dias de idade embebidos em água, ácido giberélico ou benziladenina, em concentração de 50 ppm (fig. 24a-f). Os resultados mostraram vários pontos importantes: em cotilédones presos ao embrião (fig. 24a-c) os tratamentos aplicados não tiveram efeito na atividade amilolítica.

Em cotilédones destacados (fig. 24d-f) apenas o tratamento de benziladenina mostrou efeito sobre a atividade amilolítica, promovendo-a. Este efeito promotor aumentou com a idade dos cotilédones, sendo que no 2º e 5º dias o tratamento de benziladenina foi capaz de substituir a presença do embrião, e no 7º dia de suplantá-la. Em cotilédones controle, embebidos apenas em água, a atividade amilolítica foi maior naqueles presos ao embrião. Estes dados foram novamente colocados em gráfico (figs. 25a-c) para melhor visualização.

Para se comprovar definitivamente a não influência do tratamento de ácido giberélico sobre a atividade amilolítica de cotilédones de feijão e eliminar definitivamente este tratamento dos experimentos posteriores foi feito um outro experimento utilizando-se cotilédones com 5, 6 e 10 dias de idade, com ou sem embrião. Os resultados são mostrados nas figuras 26a-c, para cotilédones presos ao embrião e nas figuras 26d-f, para cotilédones destacados. Nota-se que tanto para cotilédones destacados como presos ao embrião não houve diferenças entre os controles e o tratamento de ácido giberélico. Entretanto, mais uma vez se observa que para cotilédones controle a atividade amilolítica foi maior naqueles presos ao embrião (fig. 27). A exceção ocorreu nos cotilédones com 10 dias de idade, provavelmente devido ao fato de que nesta época os cotilédones com embrião já se encontravam sem reservas, tendo por isto diminuído sua atividade amilolítica, enquanto que para cotilédones destacados isto não ocorreu, uma vez que não existia fonte de consumo. Além disso, observa-se que embora o embrião não tenha sido necessário para a degradação das reservas, a sua presença teve um efeito

FIGURA 24. Atividade amilolítica de extratos de cotilédones de feijão com (a-c) ou sem embrião (d-f) de 2, 5, e 7 dias de idade embebidas em água (•), GA₃ (▼) ou 6BA (▲). Cada ponto representa a média de 3 valores. 2 dias: a-d; 5 dias: b-e; 7 dias: c-f.

FIGURA 24

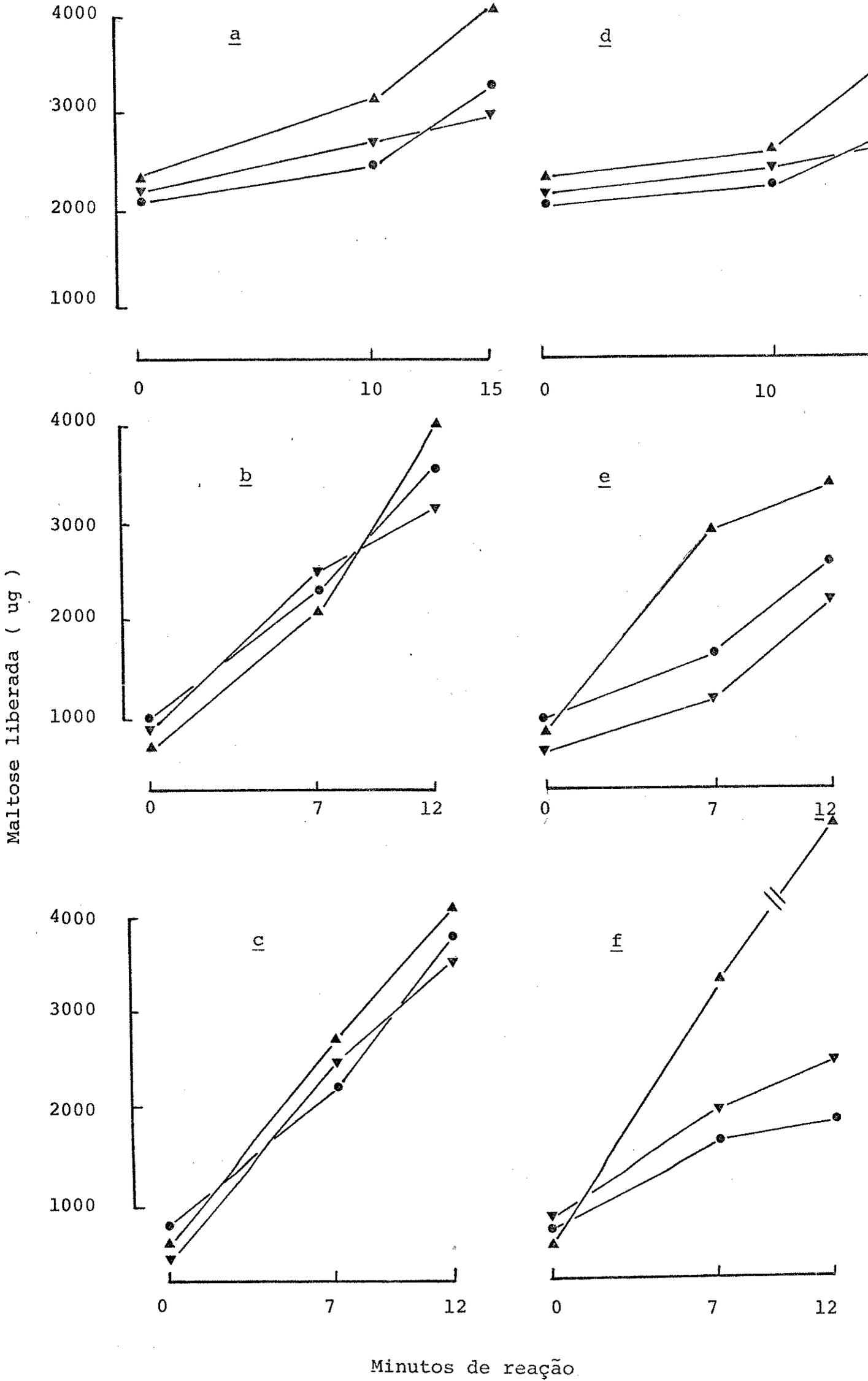


FIGURA 25. Comparação da atividade amilolítica de cotilédones de feijão embebidos em água, com (▲) ou sem (●) embrião de 2, 5 e 7 dias de idade. Cada ponto representa a média de 3 valores.

a = 2 dias

b = 5 dias

c = 7 dias

FIGURA 25

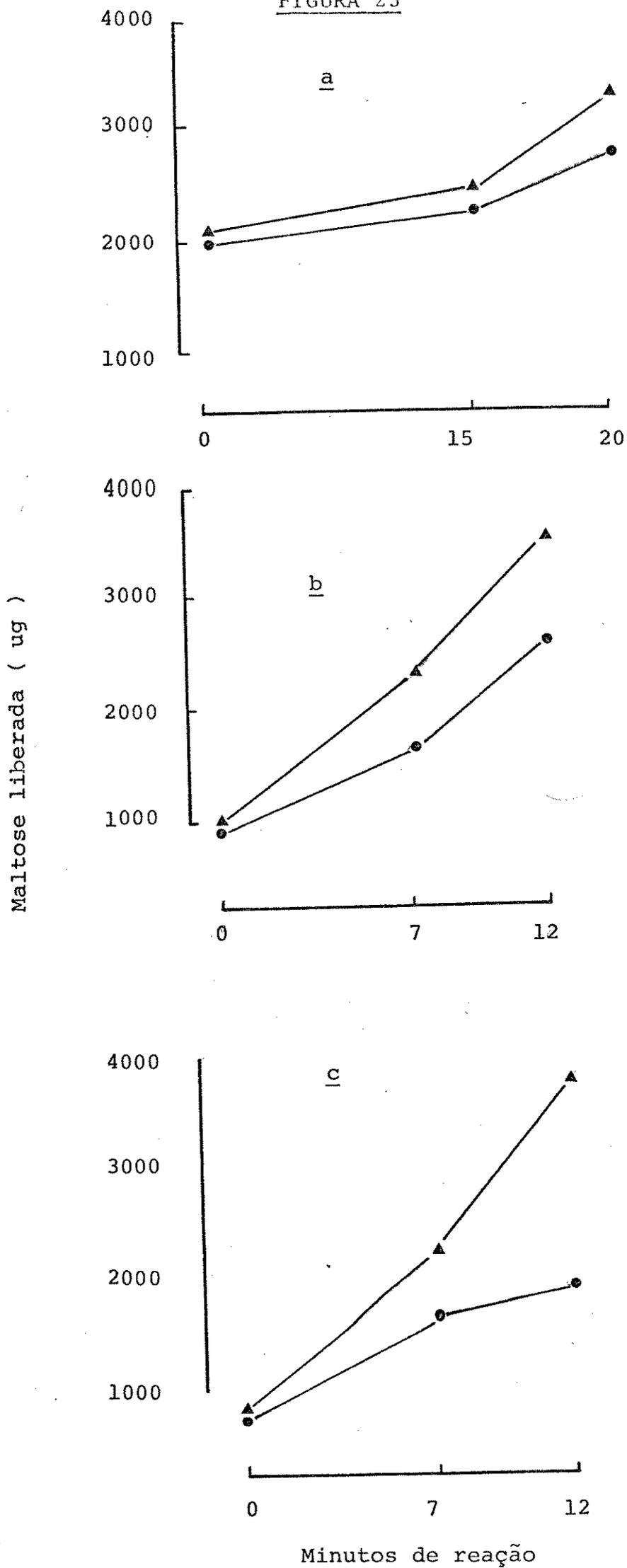


FIGURA 26. Atividade amilolítica de cotilédones de feijão com (a-c) ou sem (d-f) embrião de 5, 6 e 10 dias de idade, embebidos em água (•) ou solução de GA₃ (▼). Cada ponto representa a média de 3 valores. 5 dias: a-d, 6 dias: b - e; 10 dias: e-f.

FIGURA 26

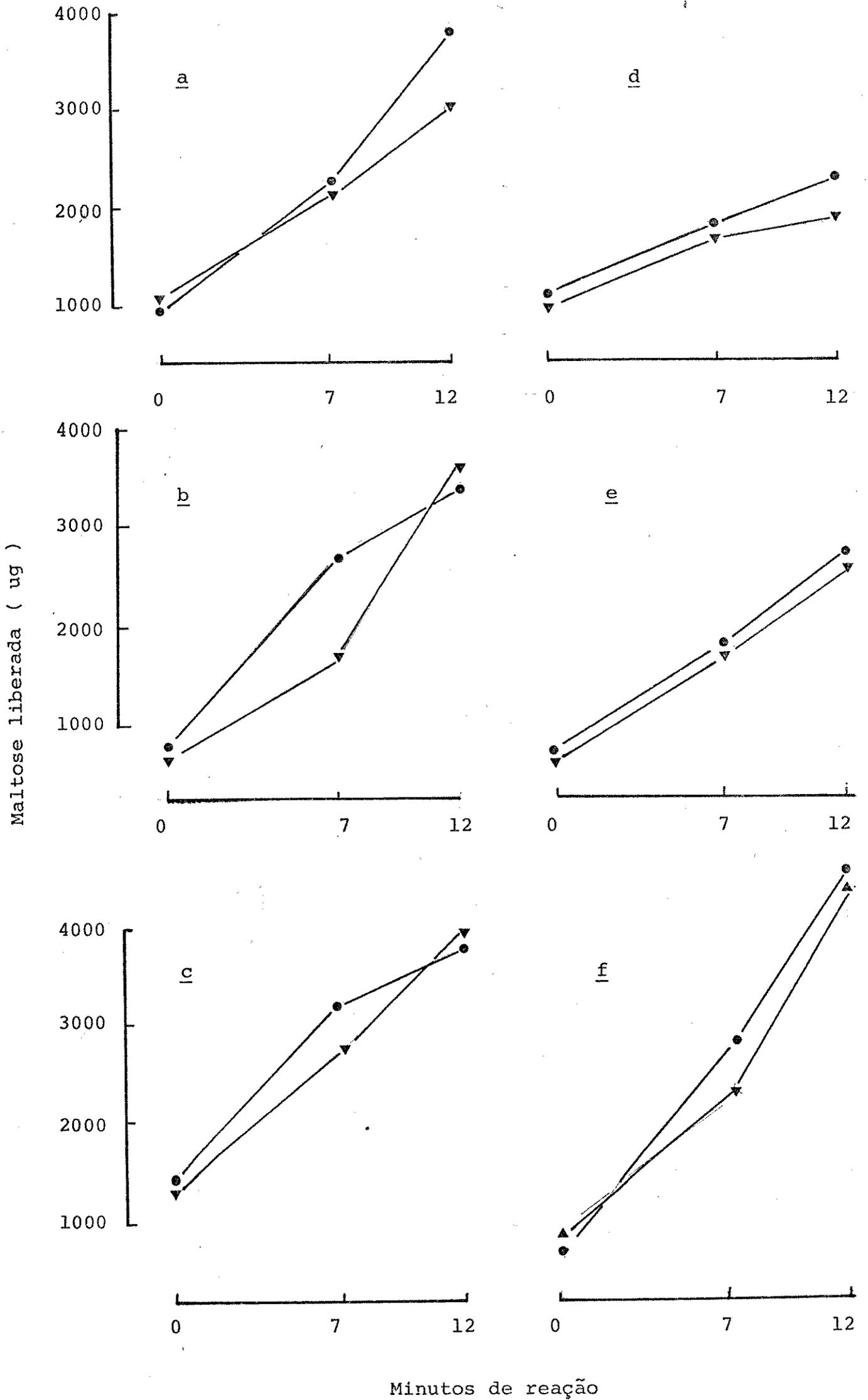
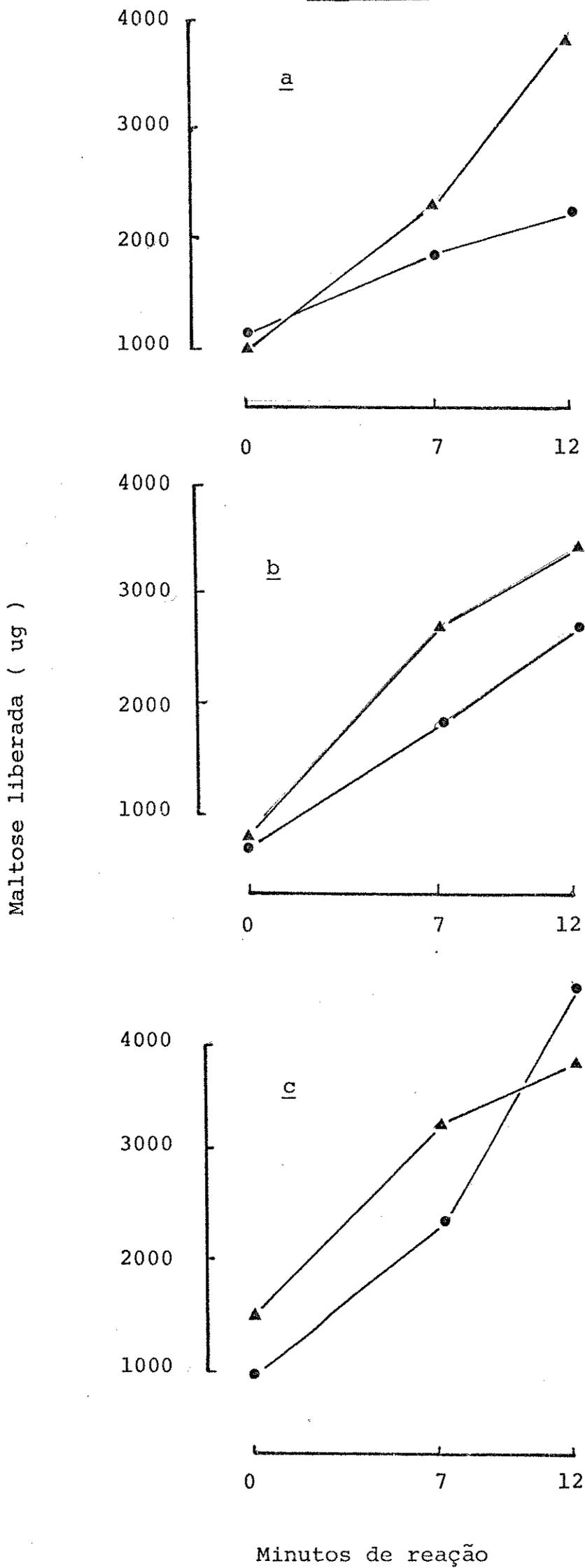


FIGURA 27. Comparação da atividade amilolítica de extratos de cotilédones de feijão embebidos em água por 5, 6, 10 dias. (▲) cotilédones com embrião, (●) cotilédones sem embrião. Cada ponto representa a média de 3 valores. 5 dias: a; 6 dias: b; 10 dias: c.

FIGURA 27



promotor na atividade amilolítica.

Estes dados estabelecem que o tratamento com Ga_3 não parece influenciar a atividade amilolítica, o que estaria de acordo com os resultados vistos no item 3, onde tanto a distribuição de matéria seca como a de proteínas não foram afetadas por este tratamento.

Também foi demonstrado que o ácido giberélico não teve efeito na atividade proteolítica; assim tanto para cotilédones presos ao embrião (28 a) como cotilédones destacados (28 b), com 5 dias de idade, o tratamento com ácido giberélico a 50 ppm não mostrou diferenças significantes. Embora não havendo efeito do tratamento sobre a atividade proteolítica, mais uma vez se observou que esta atividade foi maior na presença de embrião.

A possibilidade de que outras concentrações de ácido giberélico pudessem ter efeito na atividade proteolítica foi examinada em cotilédones presos ao embrião, onde a atividade proteolítica foi maior. Verificou-se entretanto que nenhuma das concentrações testadas entre 10^{-6} e 10^{-2} M tiveram efeito quando comparadas com o controle (fig. 28c).

Os efeitos de benziladenina sobre a atividade de amilases foram analisados em mais detalhes. Os dados são mostrados na figura 29a-m. Cotilédones de plantas com 2, 4, 5, 6, 7 e 10 dias de idade foram analisados, na presença ou na ausência de embrião. Observa-se que em cada idade analisada o tratamento com benziladenina tanto para cotilédones com embrião como cotilédones destacados mostrou efeito acentuado, promovendo a atividade amilolítica em relação ao controle, confirmando os resultados anteriores.

Com as médias dos valores mostrados na figura 29 foram calculados os coeficientes de correlação (r) e os valores de inclinação destas retas (b), que equivalem a μg de maltose liberada por minuto, e que são mostrados na tabela 7. Apesar de se ter apenas três pontos, os valores de (r) foram muito significantes, estabelecendo uma linearidade na produção de maltose durante os primeiros 12 minutos de reação, podendo-se desta forma comparar os valores de inclinação destas retas (b) para os vários tratamentos em todas as idades analisadas. No caso de cotilédones controle com 2 dias de idade, com ou sem embrião, o valor de (r) não foi significativo, não havendo linearidade por

FIGURA 28. Atividade proteolítica durante 4h de reação de extratos de cotilédones de feijão com 5 dias de idade, com embrião (fig. 29a) ou sem embrião (fig 29b) embebidos em água (•) ou GA₃ (▼).

FIGURA 28c. Efeito de várias concentrações de GA₃ na atividade proteolítica de extratos de cotilédones de feijão com embrião, após 2h de reação.

FIGURA 28

Aminoácido liberado (D.O. 620 nm)

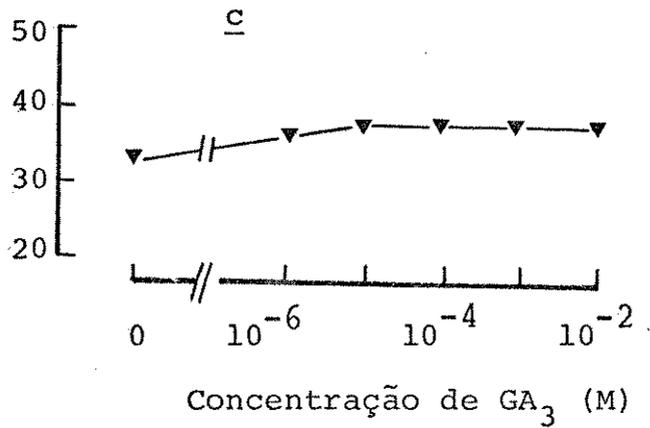
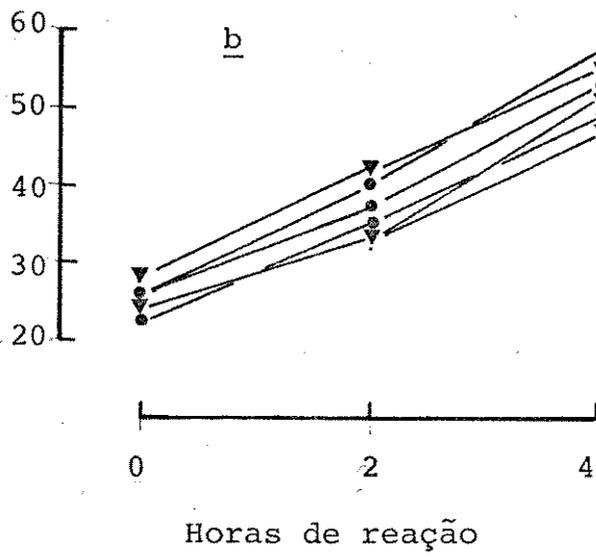
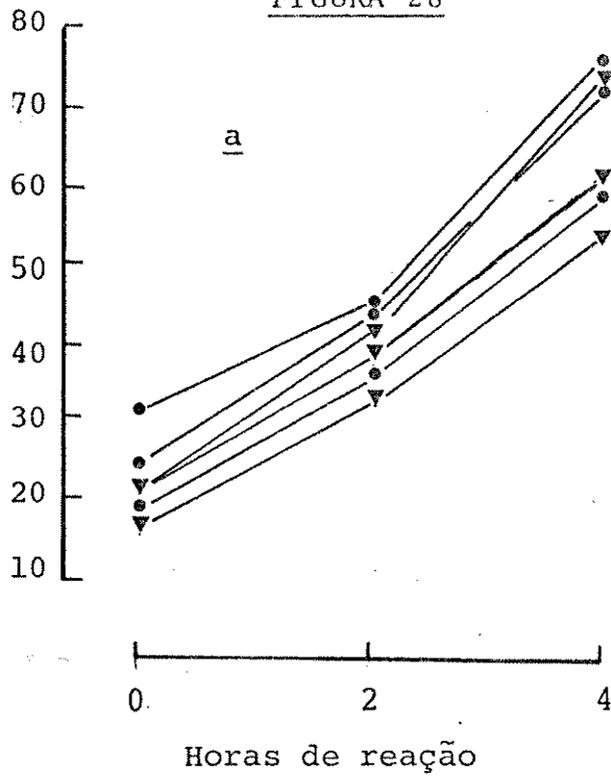


FIGURA 29. Atividade amilolítica de extratos de cotilédones de feijão com 2, 4, 5, 6, 7 e 10 dias de idade. Com embrião (fig 29-a-c-e-g-i-m) e sem embrião (fig 29-b-d-g-h-j-l), embebidos em água (•) ou 6BA (▲).

Dias 2: a; b
4: c; d
5: e; f
6: g; h
7: i; j
10: l; m

FIGURA 29

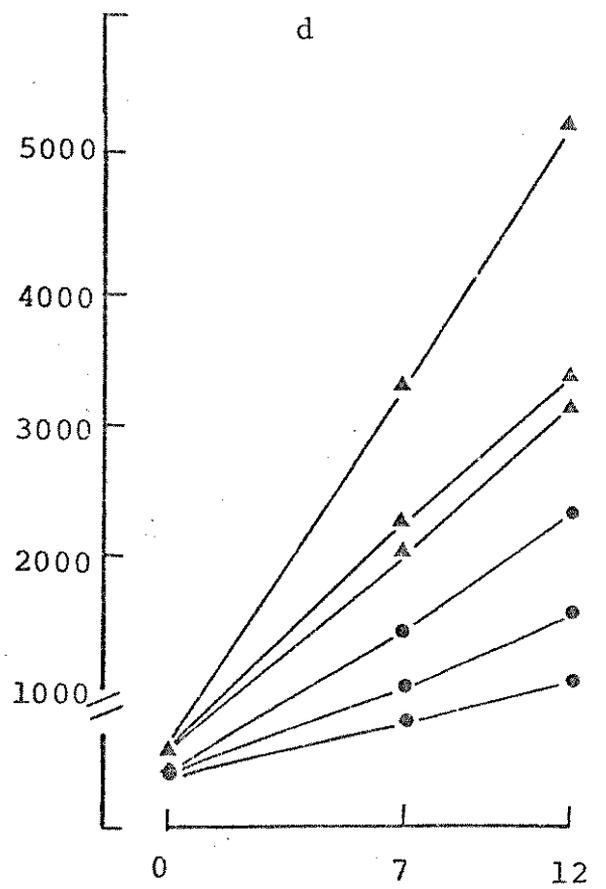
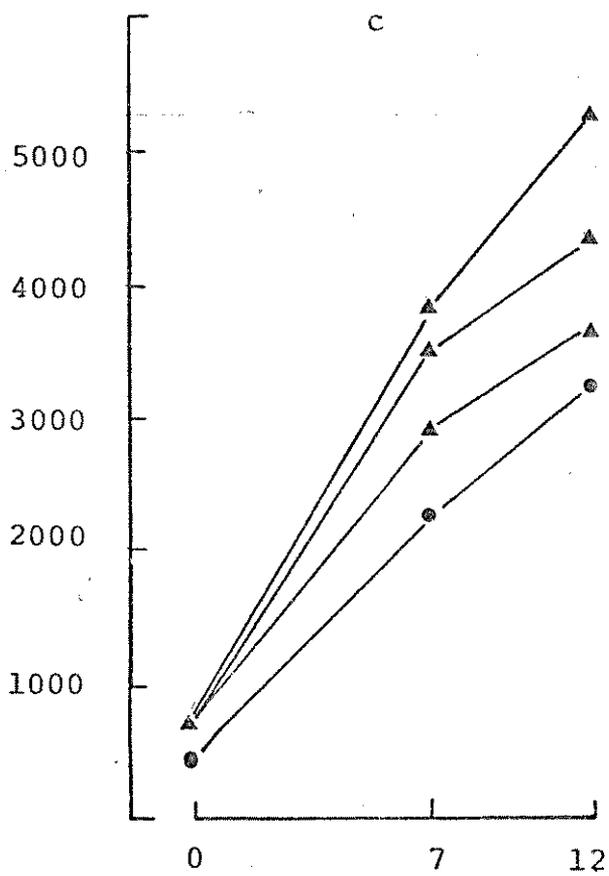
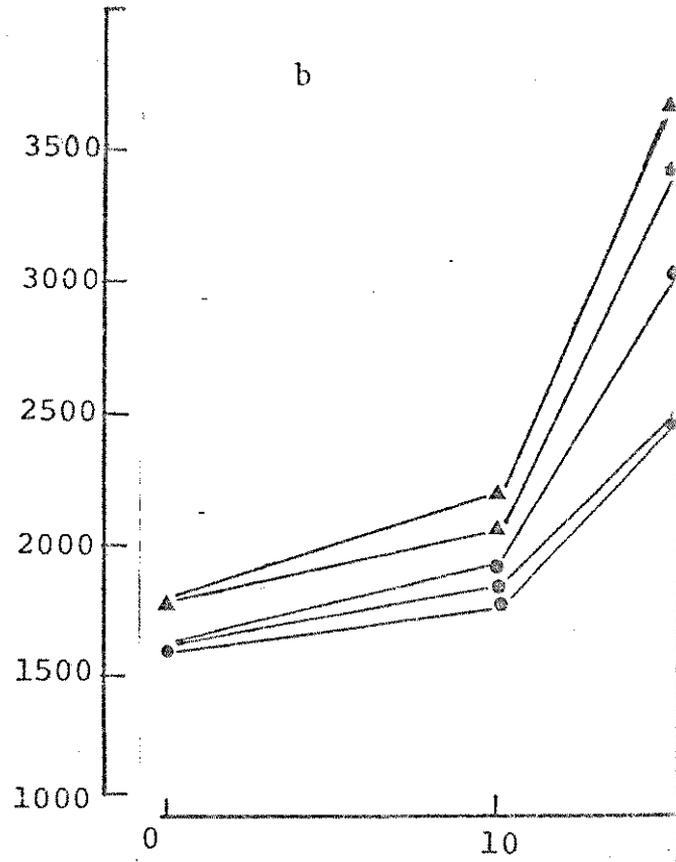
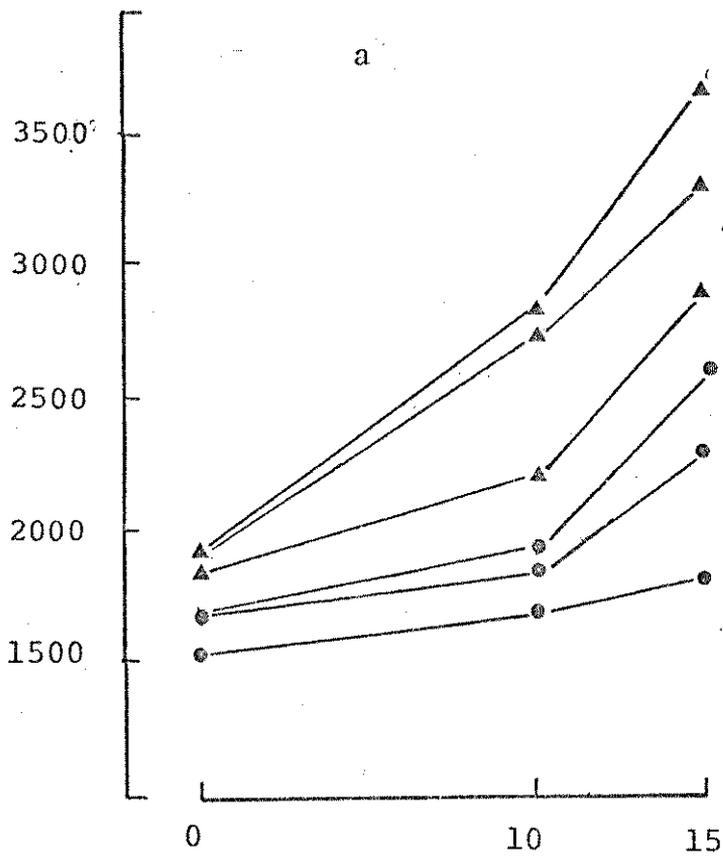


FIGURA 29

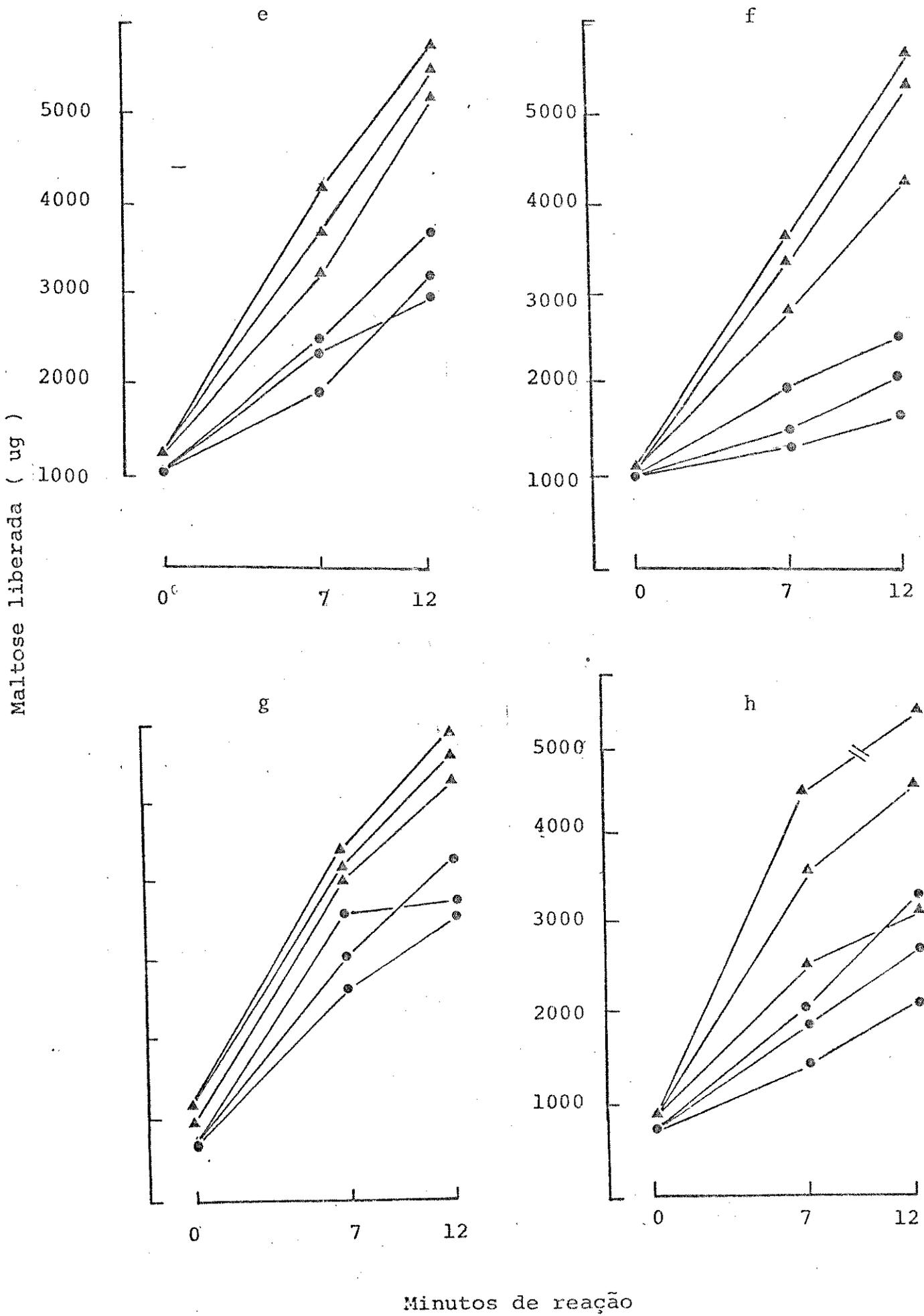
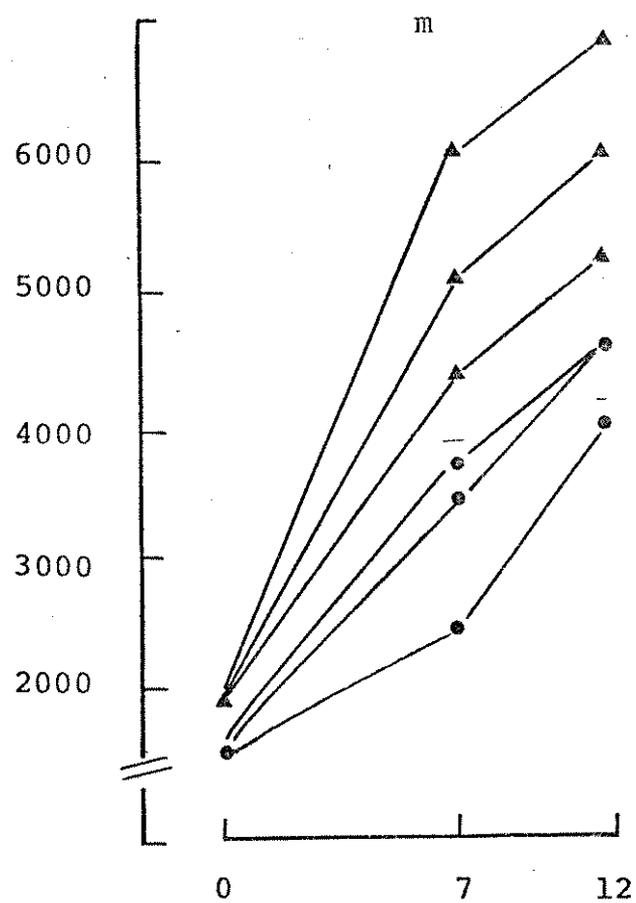
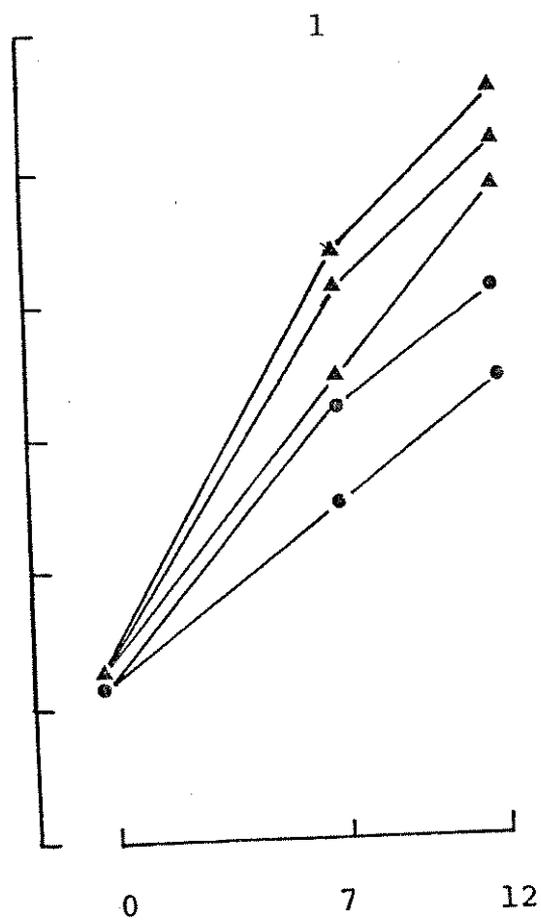
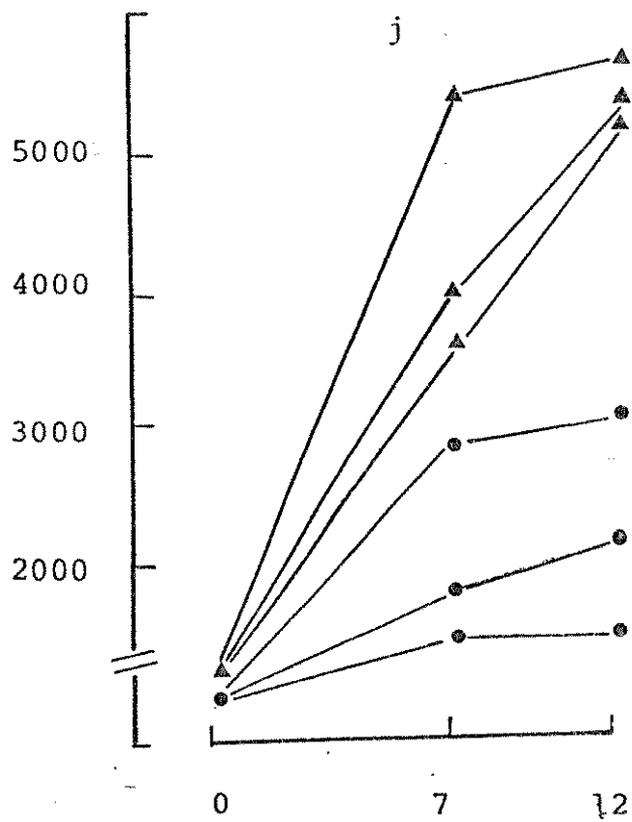
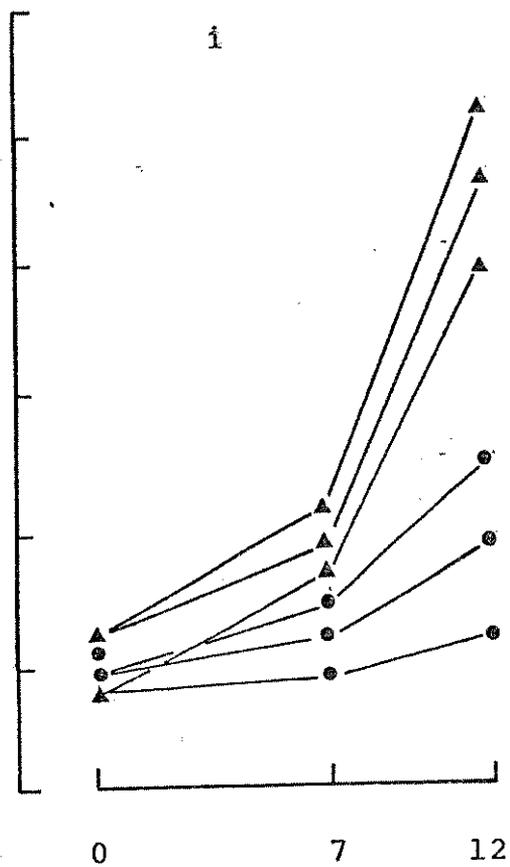


FIGURA 29

Maltose liberada (ug)



Minutos de reação

TABELA 7 - Coeficiente de correlação (r) dos valores de atividade de amilotítica durante 12 minutos de reação e atividade enzimática/minuto (b) de cotilédones de feijão controle, destacados (C⁻) ou presos ao embrião (C⁺) e de cotilédones tratados com benziladenina (50ppm) destacados (B⁻) ou presos ao embrião (B⁺).

Dias	C ⁺		C ⁻		B ⁺		B ⁻	
	r	b	r	b	r	b	r	b
2	0,901	52	0,837	77	0,972	102	0,857	106
4	0,997	243	0,999	106	0,990	321	0,999	295
5	0,991	238	0,990	98	0,990	467	0,998	414
6	0,987	232	0,996	163	0,996	368	0,985	366
7	0,951	74	0,985	103	0,926	299	0,992	392
10	0,985	213	0,999	292	0,996	344	0,998	315

causa de uma mudança na taxa de produção de maltose, sendo a taxa mais rápida entre 10 e 15 minutos que entre 5 e 10 minutos (fig. 29a e 29b); entretanto estes valores foram incluídos uma vez que a quantidade de maltose produzida durante o experimento foi bem mais baixa que em cotilédones de outras idades analisadas, sugerindo que a atividade neste dia foi pequena.

Para melhor visualização das mudanças na taxa de hidrólise do amido pelas amilases os valores de \underline{b} (μg de maltose produzida/minuto) foram plotados contra a idade da plântula (fig. 30). Observa-se claramente nesta figura que, sob tratamento de benziladenina, a taxa de hidrólise do amido (valor de \underline{b}) tanto em cotilédones destacados como nos presos ao embrião foi maior que em cotilédones controle. Esta taxa foi aumentando com a idade dos cotilédones até atingir um pico máximo no 5º dia de crescimento, tanto em cotilédones tratados como no controle, quando então houve um ligeiro decréscimo devido, talvez, ao esgotamento das reservas cotiledonares durante este período.

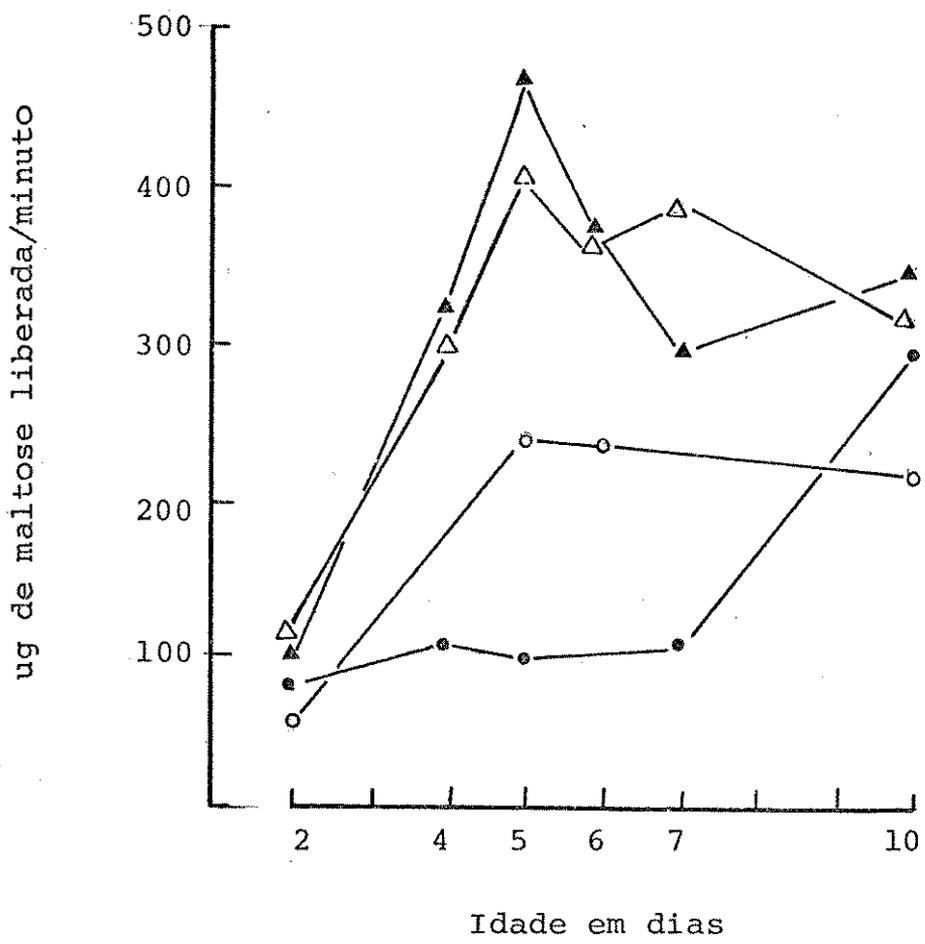
Embora em cotilédones tratados com benziladenina não tenha havido diferenças entre os destacados e os presos ao embrião, o mesmo não aconteceu para o controle: neste caso, a taxa de degradação do amido em cotilédones na presença do embrião teve o mesmo padrão observado em cotilédones tratados, embora menor; entretanto em cotilédones destacados a taxa de hidrólise foi bastante baixa até o 7º dia de crescimento, quando então começou a aumentar nitidamente, suplantando no 10º dia o valor da taxa para cotilédones com embrião.

Estes dados, em resumo, estabeleceram que embora o embrião não tenha sido necessário para o início da atividade enzimática em cotilédones controle, na sua presença, esta atividade foi invariavelmente maior. Também ficou evidenciado que o tratamento com benziladenina pode substituir a presença do embrião, ou mesmo suplantá-la em alguns casos.

As figuras 31a e 31b mostram os dados para peso fresco de cotilédones com embrião (31a) e cotilédones destacados (31b) e a figura 31c mostra o peso seco de embriões utilizados no experimento anterior. O peso seco do embrião aumentou com o decorrer do tempo, quadruplicando de valor entre os dias 2 e 7 de crescimento, após o 7º dia não houve mais aumento em peso do embrião uma vez que as reservas cotiledonares já tinham começado a se esgotar.

FIGURA 30. Atividade amilolítica (μg de maltose/minuto) entre o 2º e 10º dias de crescimento em cotilédones de feijão destacados do controle (\bullet), em cotilédones presos ao embrião do controle (\circ), em cotilédones destacados tratados com benziladenina (Δ) e em cotilédones presos ao embrião tratados com benziladenina (\blacktriangle). Cada ponto representa a média de 3 valores.

FIGURA 30



O crescimento em peso do embrião foi acompanhado por um concomitante decréscimo no peso dos cotilédones a ele ligados (31a) mostrando ter havido translocação das reservas cotiledonas para a plântula, sendo a taxa de translocação mais rápida entre os dias 3 e 6, coincidindo com o aumento nas taxas de hidrólise observadas na figura 30. É interessante notar que no caso de cotilédones destacados não houve perdas significantes de peso, naturalmente devido à falta de fonte de consumo. Também pode ser visto que o peso fresco de cotilédones destacados foi maior nas plantas tratadas com benziladenina (fig. 31b) devido, talvez, ao aumento do volume celular por absorção de água provocado pelo tratamento, uma vez que esta é uma propriedade de substâncias com atividade citocinínica.

A atividade proteolítica foi também analisada em cotilédones presos ao embrião, embebidos em água ou benziladenina. Os resultados são mostrados na tabela 8, onde observa-se que o tratamento com benziladenina teve um efeito promotor na atividade proteolítica, embora este aumento não tenha sido tão grande como o observado para atividade de amilases.

Foi visto em experimentos anteriores que sob tratamento de benziladenina houve aumento na quantidade de clorofila tanto em folhas como em cotilédones e por este motivo resolveu-se analisar a influência deste tratamento em cotilédones com embrião ou destacados, na presença ou ausência de luz.

Uma vez que feijão é uma planta epígea, podendo portanto os cotilédones fixarem carbono, resolveu-se verificar se esta nova contribuição para o fornecimento de carbono para o embrião em crescimento teria efeito na atividade amilolítica e na degradação de reservas. Para isto, neste experimento, também foi analisada a atividade de amilases e tomadas as medidas de peso fresco de cotilédones e pesos fresco e seco de embriões.

Na tabela 9a tem-se o peso fresco de cotilédones, observando-se que na luz, tanto em cotilédones controle como nos tratados com benziladenina, o peso fresco foi menor na presença do embrião, naturalmente pela existência de fonte de consumo ($p < 0,001$). Isto foi igualmente observado para os cotilédones colocados no escuro ($p < 0,001$).

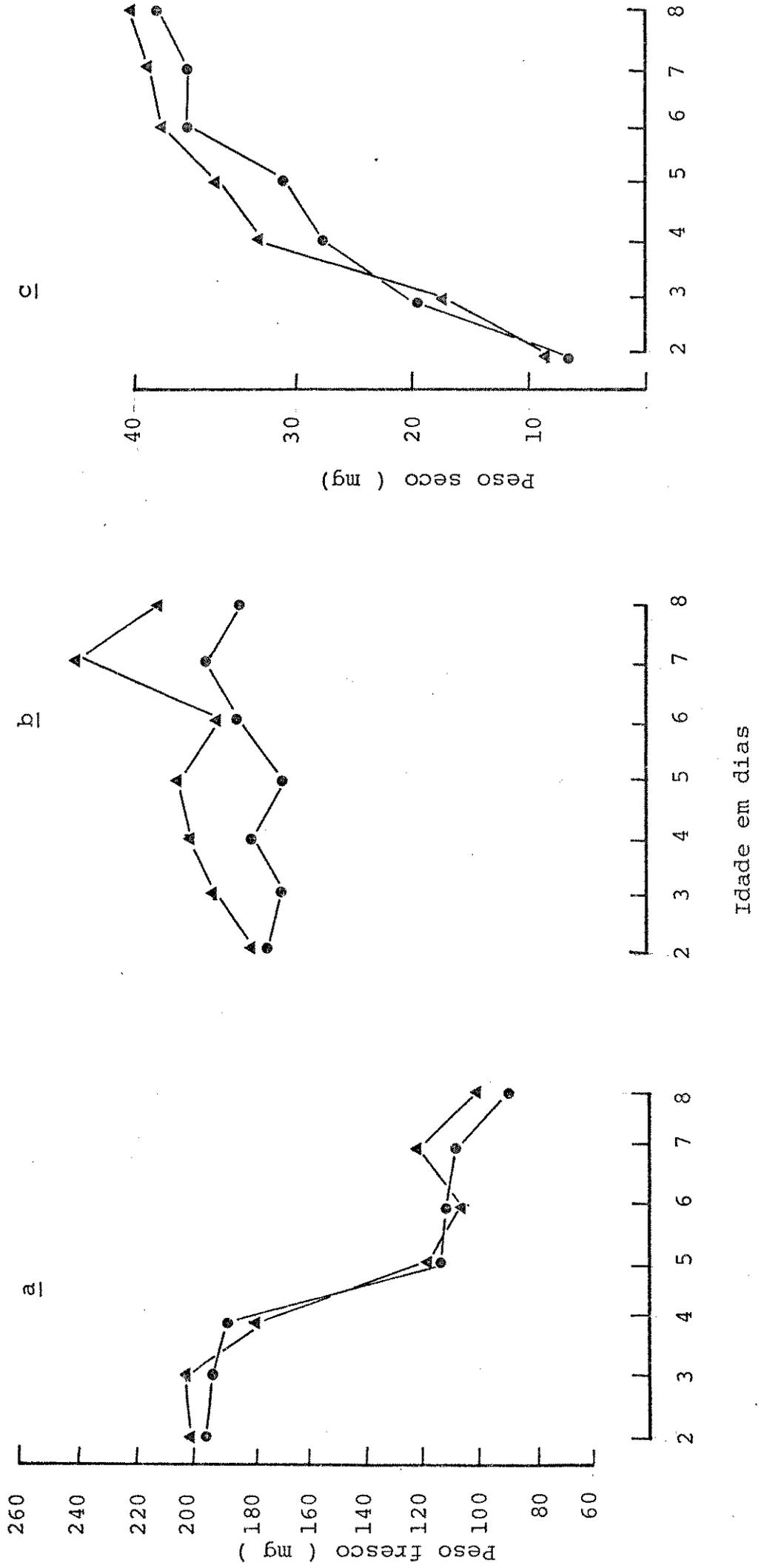
O conteúdo de clorofila a e b é mostrado na tabela 9b. Observa-se que cotilédones tratados com benziladenina apresenta

TABELA 8 - Aminoácido liberado (μg de tirosina), depois de 2 e 4 horas, em cotilédones de feijão com 7 dias de idade, com embrião, do controle ou tratados com benziladenina a 10^{-4}M . Os dados são para cotilédones individuais.

2 horas		4 horas	
controle	benziladenina	controle	benziladenina
7,0	9,5	9,5	12,5
7,5	9,0	11,5	12,5
7,0	11,5	11,0	16,0
7,2	10,0	10,7	13,7

FIGURA 31. Peso fresco de cotilédones de feijão com embrião (a) e destacados (b) tratados com benziladenina (▲) ou controle (●). Peso seco de embriões (c) de plantas tratadas com benziladenina (▲) ou controle (●). Cada ponto representa a média de 3 valores.

FIGURA 31



ram maior quantidade de clorofila que cotilédones controle, e que cotilédones destacados, tanto controle como tratados, apresentaram maior quantidade de clorofila que cotilédones presos ao embrião. A ordem crescente para o conteúdo de clorofila foi: cotilédone controle com embrião, cotilédone controle sem embrião, cotilédones com embrião tratados e cotilédones sem embrião tratados.

A proporção de clorofila a e b como componentes do total foi marcadamente constante em todos os tratamentos aplicados: a proporção de clorofila b em cotilédones com embrião ou destacados, tratados ou não com benziladenina, não apresentou variações significantes, na ordem de apenas 3%.

Os dados para a atividade amilolítica deste mesmo material são mostrados na tabela 9c. Observa-se que tanto na presença de luz como no escuro a atividade de amilase, nos vários tratamentos, concordou com experimentos anteriores, isto é, o tratamento com benziladenina promoveu a atividade amilolítica em relação ao controle tanto em cotilédones destacados como nos presos ao embrião, sendo que nos primeiros a atividade foi maior. Em cotilédones controle a atividade enzimática foi maior naqueles presos ao embrião, como vinha sendo visto nos experimentos anteriores.

Em relação ao tratamento de luz e escuro parece que apenas os cotilédones destacados com benziladenina foram afetados, sendo que na luz a atividade foi maior que no escuro. A ausência ou presença de embrião tiveram o mesmo efeito em relação à atividade amilolítica, tanto na luz como no escuro.

Uma vez que o tratamento benziladenina em concentração de 50 ppm (2×10^{-4} M) mostrou grande efeito promotor na atividade amilolítica, sendo esta atividade supra-ótima em relação aos cotilédones controle com embrião, seria interessante verificar se este efeito perduraria em concentrações abaixo desta. Assim foram analisados cotilédones destacados ou presos ao embrião, com 4 dias de idade, tratados com benziladenina em concentrações de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M. Neste experimento vários pontos importantes foram observados como pode ser visto nas figuras 32a-b.

Pela figura 32a nota-se que cotilédones que não receberam tratamento de benziladenina (controle), a atividade daque-

TABELA 9 - Medidas de peso fresco em mg (9a), conteúdo de clorofila a e b (μ g) (9b) e maltose liberada (D.O a 535nm) (9c) em cotilédones de feijão destacados ou presos ao embrião do controle ou tratados com benziladenina 10^{-4} M, colocados na luz ou no escuro.

C⁺ e C⁻ cotilédones controle com e sem embrião

B⁺ e B⁻ cotilédones tratados com e sem embrião

+++ significância a nível de 0,1%

N.S. não significante

Tabela 9a - peso fresco (mg)

	C ⁺	C ⁻	B ⁺	B ⁻
luz	120	236	188	286
escuro	110	258	106	286

Tabela 9b - conteúdo em clorofila a e b (g)

	C ⁺	C ⁻	B ⁺	B ⁻
Luz				
clorofila <u>a</u>	67	156	176	347
clorofila <u>b</u>	52	132	151	310
total	119	288	327	657
% de <u>b</u>	44	46	46	47

Tabela 9c - maltose liberada (D.O a 535 nm). Cada valor representa a média de 6 cotilédones

	C ⁺	C ⁻	B ⁺	B ⁻
Luz	27,9	17,9	34,9	62,4
Escuro	29,1	15,4	31,6	43,3
Luz x Escuro	N.S.	N.S.	N.S.	+++

les presos ao embrião foi quase duas vezes maior que a de cotilédones destacados. O fato dos cotilédones destacados terem apresentado atividade amilolítica confirma novamente que embora a atividade de amilases seja maior na presença de embrião, este não é completamente necessário para o início da degradação das reservas cotiledonares.

Em cotilédones tratados o efeito da aplicação de várias concentrações de benziladenina foi distinto em relação a cotilédones destacados ou presos ao embrião. No caso de cotilédones presos ao embrião não houve diferenças na atividade amilolítica tanto entre as várias concentrações aplicadas como em relação ao controle, mesmo as concentrações de benziladenina variando de um fator de 1000, demonstrando que a atividade encontrada foi independente do tratamento aplicado, parecendo ser controlada pelo embrião. Entretanto, em cotilédones destacados com benziladenina foi notado um aumento acentuado na atividade amilolítica com o aumento das concentrações aplicadas, sendo que em concentração de 10^{-6} M a atividade amilolítica encontrada foi igual a de cotilédones presos ao embrião e em concentrações de 10^{-5} e 10^{-4} M a atividade amilolítica em cotilédones destacados foi maior que aquela vista em cotilédones presos ao embrião.

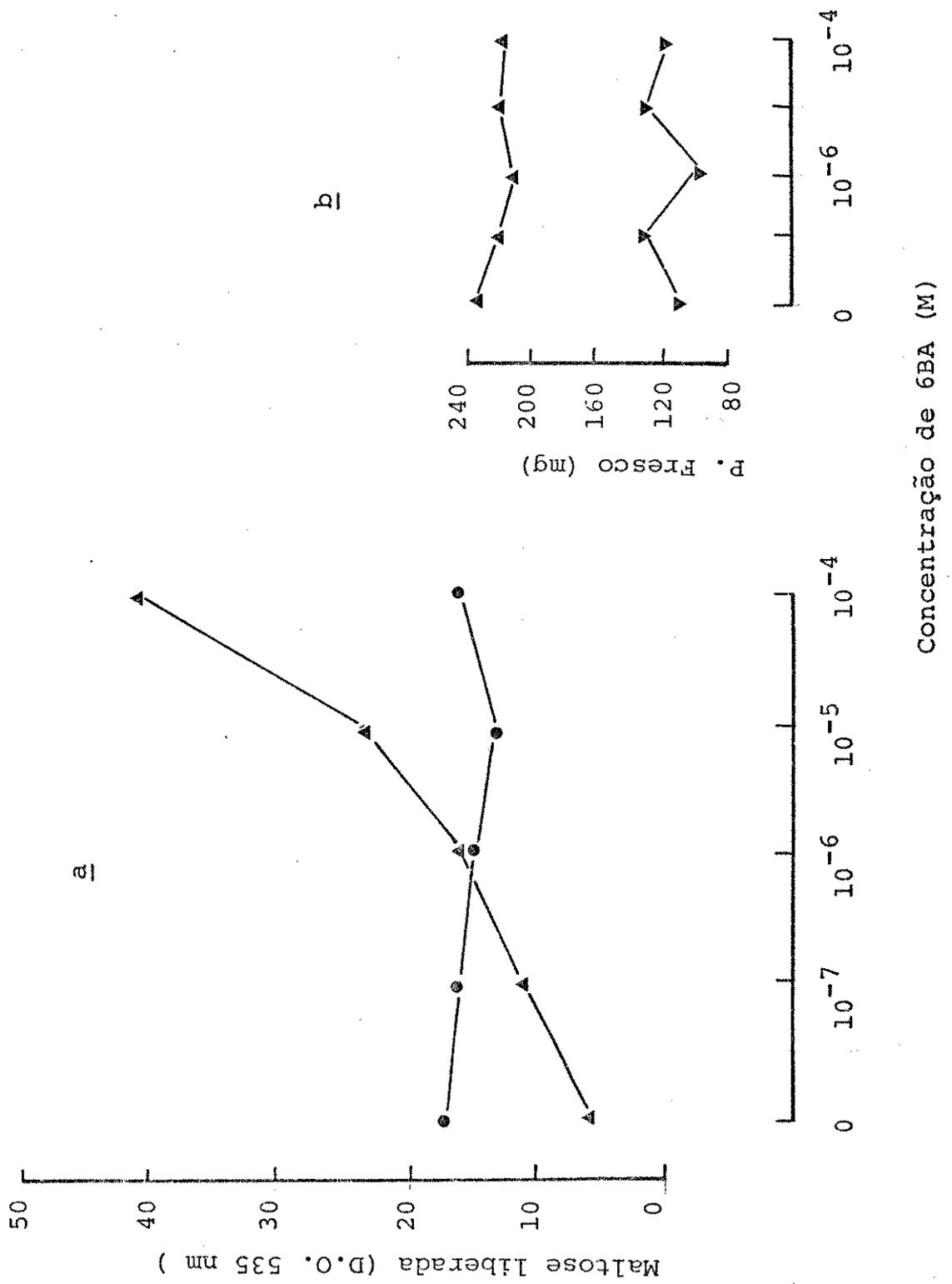
O peso fresco destes cotilédones é mostrado na figura 32b, onde observa-se que os tratamentos aplicados não tiveram efeito sobre o peso dos cotilédones destacados ou presos ao embrião, embora os segundos tenham apresentado menor peso, naturalmente, pela existência de fonte de consumo.

Já que concentrações menores que 10^{-5} M tiveram efeito na atividade amilolítica de cotilédones tratados foi interessante observar se nestas concentrações seria possível detectar alterações na morfologia externa e distribuição da matéria seca de plantas tratadas, uma vez que as concentrações aplicadas nos experimentos anteriores ainda estavam acima desta (fig. 16 e 17 onde $12,5 \text{ ppm} = 5 \times 10^{-5}$ M; $25 \text{ ppm} = 10^{-4}$ M e $50 \text{ ppm} = 2 \times 10^{-4}$ M). Assim plantas foram tratadas com concentrações de 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M e após 13 dias de crescimento, quando as reservas estavam quase esgotadas, foi feita a análise de peso fresco, peso seco, medidas de comprimento de hipocótilo, epicótilo e área foliar. Os dados são ilustrados na figura 33. O tratamento com estas concentrações, com exceção de 10^{-4} M, não mostrou efeito no com-

FIGURA 32a Efeito de várias concentrações de benziladenina na atividade de amilases de extratos de cotilédones de feijão destacados (▲) ou com embrião (●)

FIGURA 32b Peso fresco de cotilédones de feijão com embrião (▼), destacados (▲) tratados com várias concentrações de benziladenina. Cada ponto representa a média de 5 valores.

FIGURA 32



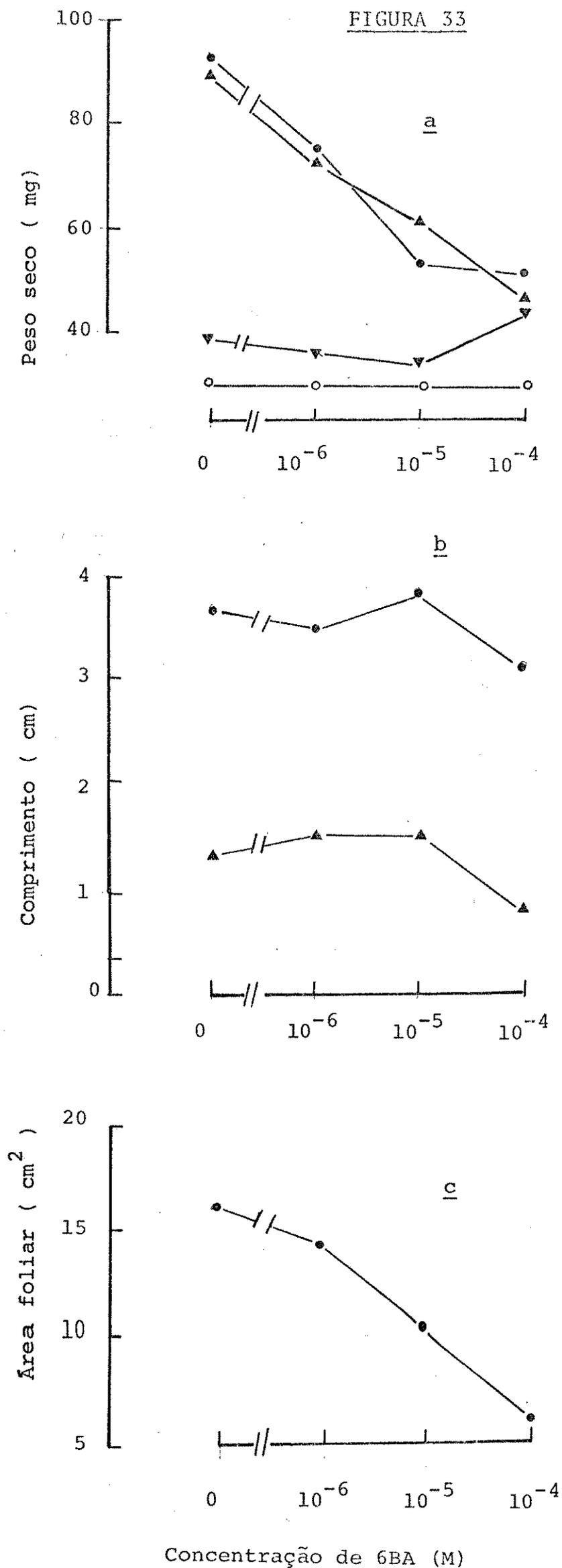
primento de hipocótilo e epicótilo (33b). Entretanto o peso seco de raiz e folha e a área foliar foram mais sensíveis e estas concentrações mais baixas de benziladenina, apresentando diminuição de crescimento com o aumento das concentrações empregadas (fig. 33a-c). Estes dados mostram que as concentrações mais baixas de 6BA, apesar de atuarem sobre a atividade amilolítica de cotilédones destacados não mostraram grande influência sobre a morfologia externa ou distribuição de matéria seca, uma vez que no primeiro caso apenas a área foliar foi afetada. Talvez seja esta a causa da diminuição de peso seco das folhas e raízes (por diminuição da área foliar), não sendo portanto afetada a distribuição de matéria seca cotiledonar, já que os cotilédones não apresentaram alteração de peso nas concentrações testadas (fig. 33a).

O observado no experimento anterior que na presença do embrião o tratamento com benziladenina em concentração de $10^{-4}M$ mostrou menor efeito sobre a atividade amilolítica que em cotilédones destacados mereceu nova análise, cujos resultados são observados nas tabelas 10a e 10b. Pode ser novamente visto que em cotilédones controle a atividade daqueles presos ao embrião foi o dobro daquela observada em cotilédones ($p < 0,001$). O efeito de tratamento de benziladenina foi confirmado, isto é, na presença de embrião a atividade amilolítica foi bem menor que a observada em cotilédones destacados ($p < 0,001$). Entretanto, cotilédones tratados com benziladenina mostraram invariavelmente maior atividade que cotilédones controle, sendo a ordem crescente para a atividade amilolítica a seguinte: controle sem embrião, controle com embrião, tratados com embrião e tratados sem embrião.

O peso fresco destes cotilédones foi analisado e os dados são observados nas tabelas 11a e 11b. Nota-se que tanto para cotilédones controle como para os tratados com benziladenina o peso fresco foi maior em cotilédones destacados ($p < 0,001$). Nos cotilédones destacados não houve diferenças entre controle e tratamento com benziladenina, mas nos presos ao embrião o tratamento diminuiu ligeiramente o peso dos cotilédones, sendo esta diferença significativa a nível de 5%. A análise estatística de pesos fresco e seco de embriões não mostrou diferenças significativas entre tratamento de benziladenina e controle.

FIGURA 33. Medidas de peso seco (a) de raiz (\blacktriangle), caule (\blacktriangledown) cot. (\circ) e folhas (\bullet) medidas de comprimento (b) de hipocótilo (\bullet), epicótilo (\blacktriangle) e área foliar (c) de plantas de feijão tratadas com várias concentrações de benziladenina. Cada ponto representa a média de 10 valores.

FIGURA 33



Concentração de 6BA (M)

TABELA 10 - Atividade de amilase em cotilédones individuais de feijão, destacados ou presos ao embrião do controle ou tratados com benziladenina. Os dados estão expressos em D.O a 535 nm x 10⁻² (10a). As interações entre cada um destes tratamentos estão na tabela 10b

C⁺ e C⁻ cotilédones controle com embrião ou destacados

B⁺ e B⁻ cotilédones tratados com embrião ou destacados

+++ significância a nível de 0,1%

Tabela 10a

Cotilédone	C ⁻	C ⁺	B ⁻	B ⁺
1	14,2	21,4	43,9	26,2
2	13,3	26,2	68,0	29,1
3	17,3	26,0	47,7	39,4
4	9,2	25,4	53,0	25,2
5	18,6	22,8	52,0	37,9
6	11,7	21,9	53,9	35,7
7	10,4	23,8	52,2	45,9
8	12,8	21,4	58,0	34,7
∑	13,4	23,7	53,6	34,3

Tabela 10 b

	C ⁺	C ⁻	B ⁺	B ⁻
C ⁺	-	+++	+++	+++
C ⁻	-	-	+++	+++
B ⁺	-	-	-	+++
B ⁻	-	-	-	-

TABELA 11

TABELA 11a - Peso fresco (mg) de cotilédones de feijão destacados ou presos ao embrião, embebidos em água ou em benziladenina ($10^{-4}M$), utilizados para medida de atividade enzimática. (11a)

C^+ e C^- - cotilédones do controle com e sem embrião
 B^+ e B^- - cotilédones tratados com e sem embrião

Cotilédones	C^+	C^-	B^+	B^-
1	150	210	100	230
2	180	220	130	210
3	150	210	200	200
4	200	190	110	260
5	200	200	160	220
6	170	220	130	240
7	160	200	200	220
8	170	210	130	220
\bar{x}	<u>173</u>	<u>208</u>	<u>145</u>	<u>225</u>

TABELA 11b - As interações entre cada um dos tratamentos da tabela acima.

+ significância a nível de 5%

++ significância a nível de 1%

+++ significância a nível de 0,1%

N.S. não significante

	C^+	C^-	B^+	B^-
C^+	-	++	+	+++
C^-	-	-	+++	N.S.
B^+	-	-	-	+++
B^-	-	-	-	-

O observado nos experimentos anteriores que o efeito de benziladenina sobre a atividade amilolítica era maior em cotilédones destacados que nos presos ao embrião, sugeriu que poderia haver um controle pelo embrião sobre a atividade amilolítica mediada pela benziladenina exógena, através, talvez, de um inibidor presente no tecido embrionário.

Esta hipótese foi testada partindo-se do princípio que a mistura do extrato de cotilédones com embrião (presença de inibidor) com o extrato de cotilédones destacados (ausência de inibidor) resultaria num extrato cuja atividade amilolítica deveria ser menor que a soma da atividade amilolítica de cada extrato em separado. Assim foi montado um experimento onde foram feitas várias misturas de extratos de cotilédones destacados ou com embrião, tratados com benziladenina 10^{-4} M, nas proporções de: $1^+ : 1^-$, $1^+ : 3^-$ e $3^+ : 1^-$, onde os sinais (+) e (-) significam extratos de cotilédones com embrião ou sem embrião, respectivamente.

A tabela 12a mostra a atividade de seis cotilédones tratados com benziladenina na presença ou ausência de embrião, onde 0,25 ml de extrato foi incubado com 1 ml de amido. Novamente foi verificado que a atividade em cotilédones sem embrião foi maior que aquela de cotilédones presos ao embrião ($p < 0,001$).

O extrato de quatro destes cotilédones (com ou sem embrião) foram utilizados para a análise de inibidor, através das misturas mencionadas acima. A atividade enzimática de 0,5ml da mistura destes extratos é mostrada na tabela 42b. Pode ser visto como esperado que onde a proporção de extrato de cotilédones com embrião foi maior (possível presença de inibidor) a atividade da mistura dos extratos foi menor. Assim as médias das atividades amilolíticas são crescentes da coluna um para a coluna três.

Na tabela 12c são apresentadas evidências da presença de inibidor. A coluna c apresenta o valor esperado para a atividade da mistura dos extratos na ausência de inibidor, baseados sobre os dados da tabela 12a: assim, 0,5 ml da mistura de $1^+ : 1^-$, se não houvesse inibidor, deveria apresentar uma atividade amilolítica equivalente a soma das atividades de cada componente da mistura em particular, ou seja, $19,1 + 45,4 = 66,5$ ($0,25 \text{ ml}^+ + 0,25 \text{ ml}^-$), entretanto pode ser visto na coluna D que

TABELA 12

Tabela 12a - Maltose liberada (D.O. a 535 nm x 10²) em 0,25 ml de extrato de cotilédones de feijão, destacados ou presos ao embrião, tratados com benziladenina 10⁻⁴M.

Cotilédone	Com embrião	Sem embrião
1	19,1	45,4
2	14,2	36,4
3	13,8	42,2
4	15,6	41,6
5	22,3	45,9
6	18,8	39,4
\bar{x}	17,3	41,5

Tabela 12b - Maltose liberada (D.O. a 535 nm x 10²) em 0,5 ml de misturas de extratos de cotilédones de feijão tratados com benziladenina, destacados (-) ou presos ao embrião (+).

MISTURAS

Cotilédone	1	2	3
	3 ⁺ :1 ⁻	1 ⁺ :1 ⁻	1 ⁺ :3 ⁻
1	23,3	32,0	35,8
2	25,8	34,6	42,8
3	20,8	37,9	40,2
4	27,8	35,7	44,0
\bar{x}	24,4	35,0	40,7

Tabela 12c - Valores esperados e valores observados para 0,5 ml de misturas de extratos de cotilédones de feijão nas proporções de $3^+ : 1^-$; $1^+ : 1^-$ e $3^- : 1^+$. Os sinais (+) e (-) significam presença e ausência de embrião respectivamente.

PLANTA	A		B		C	D
	mistura + -	valor observado pela tab. 12a		valor observado	valor esperado (soma da col. B)	valor observado
1	3 : 1	28,8	+	22,7	51,5	23,3
	1 : 1	19,1	+	45,4	66,5	32,0
	1 : 3	68,1	+	9,6	77,7	35,8
2	3 : 1	21,3	+	17,3	42,6	25,8
	1 : 1	14,2	+	34,6	48,8	34,6
	1 : 3	51,9	+	7,1	59,0	42,8
3	3 : 1	20,7	+	21,1	41,8	20,8
	1 : 1	13,8	+	42,2	56,0	37,9
	1 : 3	63,1	+	6,9	70,2	40,2
4	3 : 1	23,4	+	20,8	44,2	27,8
	1 : 1	15,6	+	41,6	57,2	35,7
	1 : 3	62,4	+	7,8	70,2	44,0

Cálculo dos valores da coluna B

Tomando-se como exemplo a proporção de $3^+ : 1^-$ da planta 1, tem-se: $3^+ : 1^-$ equivale a 0,375 ml do extrato com embrião: 0,125 ml do extrato de cotilédones destacados.

Se 0,25 ml de extrato de cotilédones com embrião equivalem a 19,1, então 0,375 ml equivalem a 28,8.

Se 0,25 ml de extrato de cotilédones destacados equivalem a 45,4, então, 0,125 ml equivalem a 22,7.

Assim, o valor esperado para a mistura na proporção de $3^+ : 1^-$ será $28,8 + 22,7 = 51,5$.

a atividade observada nas misturas foi sempre menor que o valor esperado para a soma dos componentes, indicando que cotilédones com embrião não simplesmente apresentavam menor quantidade de enzimas, mas, ao contrário, apresentavam um inibidor que pode afetar a atividade enzimática de extratos de cotilédones destacados.

Este experimento foi repetido em mais detalhe utilizando-se além das misturas de extratos já mencionadas, misturas de extratos onde aquele supostamente com inibidor foi fervido a fim de destruir a atividade amilolítica presente. Desta vez não foram utilizados cotilédones individuais, mas sim extrato de 10 cotilédones.

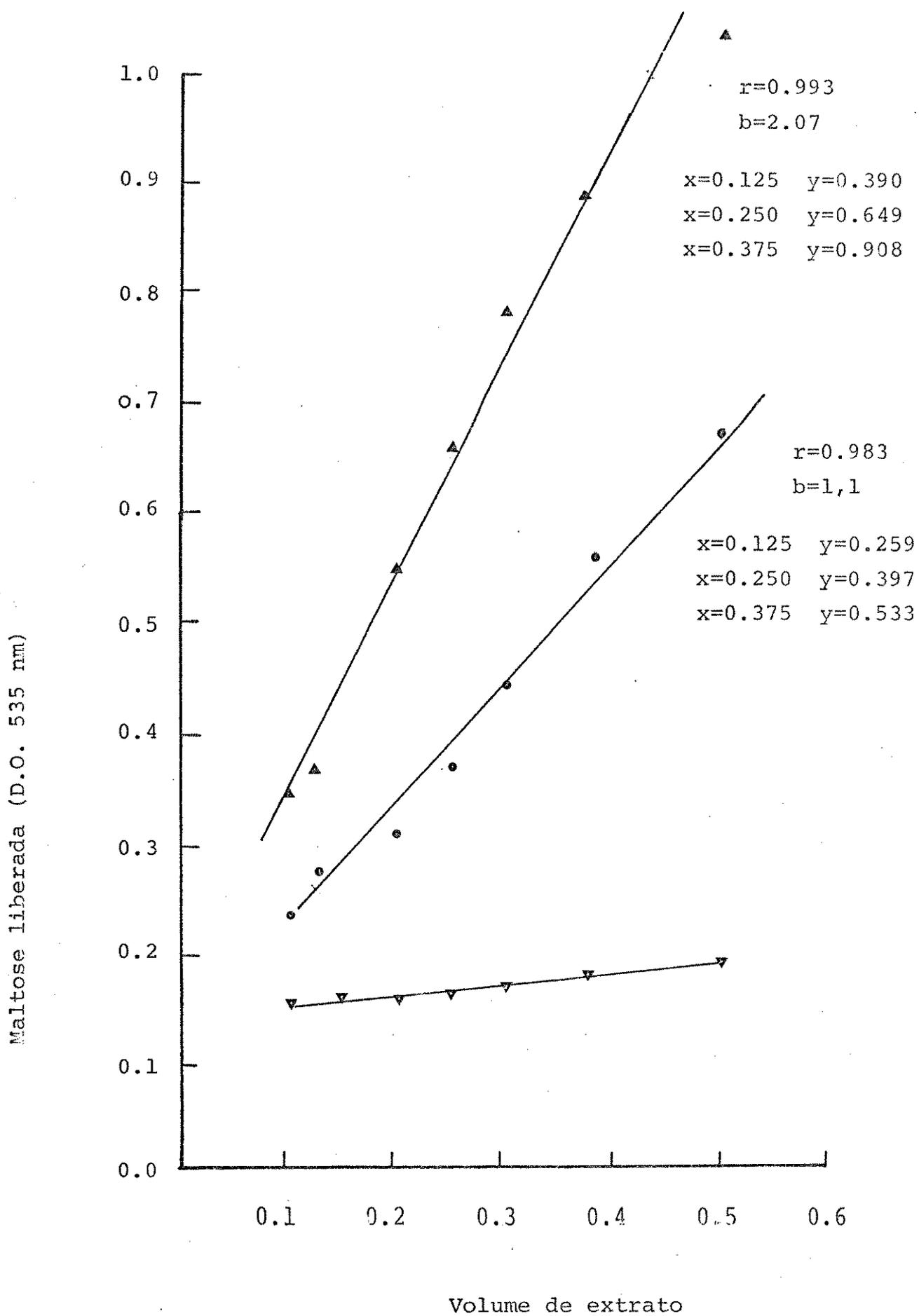
O primeiro passo neste experimento foi mostrar que extratos de cotilédones com embrião apresentavam realmente menor atividade amilolítica que os destacados. Isto foi confirmado pelos dados da tabela 13a, onde a atividade de cotilédones com embrião foi somente 35% da atividade de cotilédones destacados. Tendo sido estabelecido que a atividade dos dois extratos foi bem distinta, procurou-se obter o valor de atividade amilolítica para volumes diferentes destes extratos (fig. 34) para se poder posteriormente calcular a atividade das misturas feitas onde há diferentes volumes de cada extrato analisado. Pela figura 34 pode ser observado que a atividade amilolítica foi função do volume da alíquota, obtendo-se uma relação linear ($p < 0,001$). Através destas retas calculou-se a atividade amilolítica para 0,125 ml, 0,25 ml e 0,375 ml, que foram os volumes utilizados nas misturas feitas. As absorbâncias obtidas a 535 nm para estes volumes são também dadas na figura 34.

A seguir a atividade de misturas com proporções diferentes de extratos de cotilédones com ou sem embrião foram analisadas: as proporções foram $3^+ : 1^-$, $1^+ : 1^-$ e $1^+ : 3^-$ e os dados são mostrados na tabela 13b. Nota-se novamente que as misturas que continham maior proporção de extrato de cotilédones destacados tiveram maior atividade.

O extrato que possivelmente teria inibidor foi fervido e novamente sua atividade foi testada para vários volumes. Nota-se pela figura 34 que este tratamento foi efetivo, removendo a atividade enzimática. O pequeno aumento observado na densidade ótica foi devido à pequena quantidade da maltose no extrato,

FIGURA 34. Atividade de amilase, durante 7 minutos de reação, em vários volumes de extratos de cotilédones de feijão, tratados com benziladenina, na ausência (▲) ou presença de embrião (●) ou de extrato fervido na presença de embrião (▼).

FIGURA 34



que obviamente aumenta com o aumento do volume da alíquota. Assim, as misturas anteriores foram repetidas, mas desta vez utilizando-se o extrato fervido de cotilédones com embrião. Estes dados são mostrados na tabela 13c. Novamente foi notado que a mistura que teve maior quantidade de extrato sem embrião foi a que apresentou maior atividade. Mas, nota-se esta vez que, em comparação com os dados da tabela 13b, a atividade das misturas foi menor uma vez que uma parcela das enzimas foi destruída pela fervura. Através dos dados obtidos para a atividade amilolítica em volumes diferentes foi possível comparar os valores observados com os valores esperados, podendo ser verificado a existência ou não de inibidores. Estes dados são mostrados nas tabelas 13d (extratos não fervidos) e 13e (extrato fervido).

Ambas as tabelas mostram na primeira coluna os volumes de extratos de cotilédones com e sem embrião presentes na mistura. A segunda coluna mostra a absorvância esperada (através dos dados calculados pela figura 34) e a terceira coluna mostra os dados observados para cada mistura, dados estes provenientes das tabelas 13b e 13c. Nota-se que para todas as misturas, antes da fervura, e após a fervura, que a atividade observada foi sempre menor que aquela teoricamente esperada e que após ferver o observado foi ainda menor. Esta diminuição mostrada na última coluna da tabela 13e não foi devido simplesmente a uma redução proporcional em relação aos valores da tabela 13d para cada mistura, mas foi relativamente maior onde a proporção de extrato de cotilédones com embrião foi maior. Isto sugere que embora a fervura tenha destruído a enzima, o inibidor permaneceu, havendo conseqüentemente mais inibidor para menos enzima em cada mistura e assim os efeitos de inibição foram maiores na mistura com a proporção de $3^+ : 3^-$ que na mistura de proporção $1^+ : 3^-$.

Uma vez demonstrado que o tratamento de benziladenina teve efeito sobre a atividade amilolítica em cotilédones de feijão, resolveu-se verificar se este tratamento teria influência sobre o padrão de desenvolvimento da atividade amilolítica e proteolítica durante o crescimento da plântula. Assim, de plantas com 3, 5, 7, 9 e 11 dias de idade foram retirados os cotilédones e analisados para a atividade amilolítica e proteolítica.

Os dados para peso fresco de cotilédones e embriões es-

TABELA 13

Tabela 13a - Atividade amilolítica (D.O. a 535 nm) de 0,5 ml da extração de cotilédones de feijão com (+) ou sem (-) embrião.

extrato (+)	extrato (-)
0,566	0,852

Tabela 13b - atividade amilolítica de 0,5 ml de misturas de extratos de cotilédones com (+) e sem (-) embrião

Misturas	D.O. 535nm
3 ⁺ :1 ⁻	0,702
1 ⁺ :1 ⁻	0,720
1 ⁺ :3 ⁻	0,821

Tabela 13c - atividade amilolítica de 0,5 ml de mistura de extratos de cotilédones sem embrião (-) e de extrato fervido de cotilédones com embrião (+).

Misturas	D.O. 535nm
3 ⁺ :1 ⁻	0,420
1 ⁺ :1 ⁻	0,642
1 ⁺ :3 ⁻	0,858

Tabela 13d - valores esperados e valores observados para 0,5 ml de misturas de extratos com (+) e sem (-) embrião

Misturas (ml)		D.O. esperada		D.O. observada
+	-	(535 nm)		(535 nm)
0,375	0,125	0,535 + 0,390	0,925	0,702
0,250	0,250	0,397 + 0,649	1,046	0,720
0,125	0,375	0,259 + 0,908	1,167	0,821

Tabela 13e - valores esperados e valores observados para 0,5 ml de misturas de extratos de cotilédones sem embrião (-) e de extratos fervidos de cotilédones com em brião (+)

Misturas (ml)		D.O. esperada		D.O. observada
+	-	(535 nm)		(535 nm)
0,375	0,125	0,180 + 0,390	0,570	0,420
0,250	0,250	0,168 + 0,649	0,817	0,642
0,125	0,375	0,155 + 0,908	1,063	0,858

tão nas figuras 35a-b. Observa-se que houve translocação do material do cotilédone para o embrião durante o crescimento da plântula, uma vez que houve diminuição do peso dos cotilédones acompanhada por um aumento no peso do embrião. Este crescimento foi menor em plantas tratadas com benziladenina, tanto em termos de peso fresco como de peso seco (fig. 35b-c). Assim nos últimos dias do experimento os cotilédones tratados apresentaram maior peso fresco que o controle, devido a menor translocação de reservas (fig. 35a).

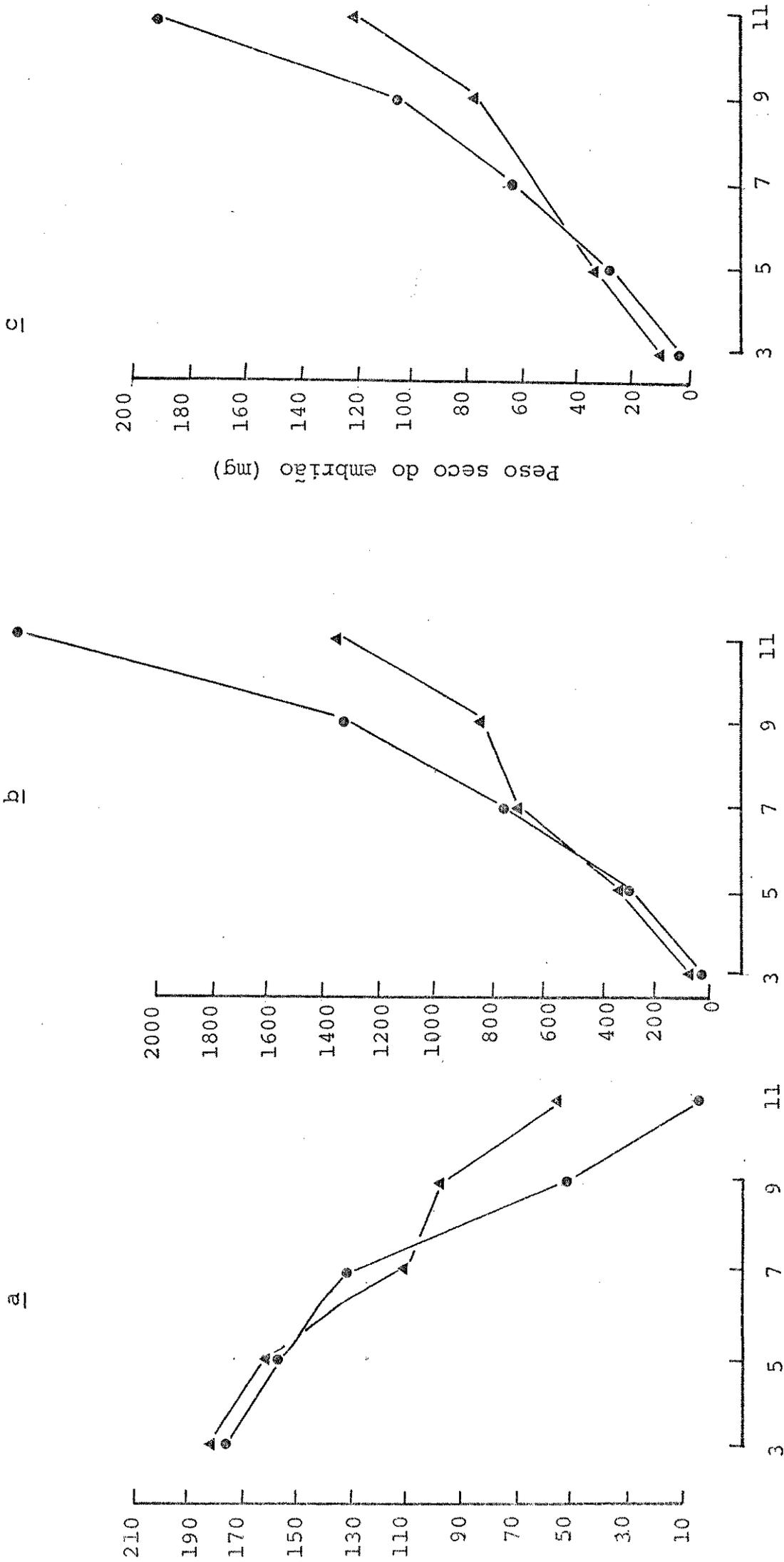
O desenvolvimento da atividade amilolítica foi examinado entre os dias 3 e 11 (fig. 36a), desde que em experimentos preliminares não foi encontrada atividade amilolítica antes de 44 horas de embebição da semente. Observa-se após o 3º dia de germinação que a atividade em cotilédones tratados foi maior que a atividade em cotilédones controle em todas as idades examinadas. Embora tenha havido diferenças na atividade enzimática entre os tratamentos de benziladenina e controle, o padrão de desenvolvimento desta atividade foi semelhante nos dois casos: aumentando de uma maneira linear entre o 3º e 9º dias de crescimento, época em que as reservas foram rapidamente utilizadas (fig. 35a), tendo uma diminuição drástica somente no 11º dia, quando as reservas cotiledonares já estavam esgotadas. No 9º dia de crescimento a atividade amilolítica alcançou seu pico máximo, sendo em cotilédones controle 240% maior e em cotilédones tratados 315% maior em relação ao 3º dia de crescimento.

A influência do tratamento de benziladenina sobre a atividade proteolítica também foi analisada (fig. 36b). Como observado para amilases (fig. 36a), a atividade proteolítica foi maior em cotilédones tratados em todas as idades testadas. O padrão de desenvolvimento desta atividade foi semelhante nos dois casos. As mudanças na atividade proteolítica não foram tão nítidas como aquelas observadas para amilases: enquanto houve um aumento contínuo na atividade amilolítica até o 9º dia de crescimento, a atividade proteolítica aumentou até o 5º dia, mantendo este nível constante até o 9º dia, diminuindo após este período.

Este experimento foi repetido em mais detalhe, analisando-se a atividade de amilases, tanto de α amilases como de β amilases; proteases, mudanças nos níveis de açúcares livres e amino

FIGURA 35. Peso fresco de cotilédones (a), peso fresco (b) e seco (c) de embriões de plantas de feijão controle (●) ou tratadas com benziladenina (▲). Cada ponto representa a média de 6 valores.

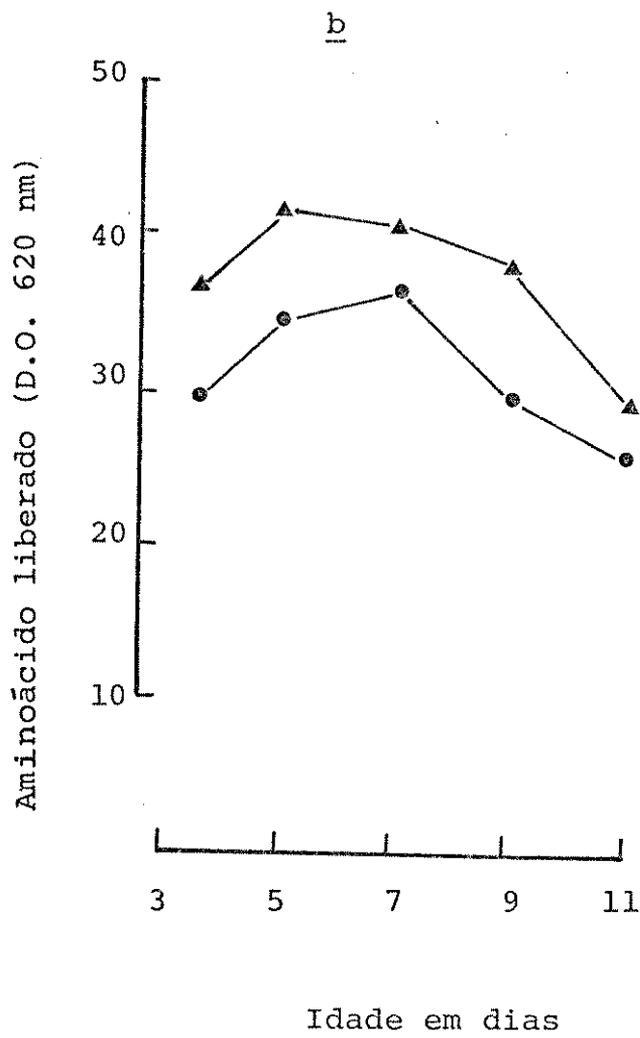
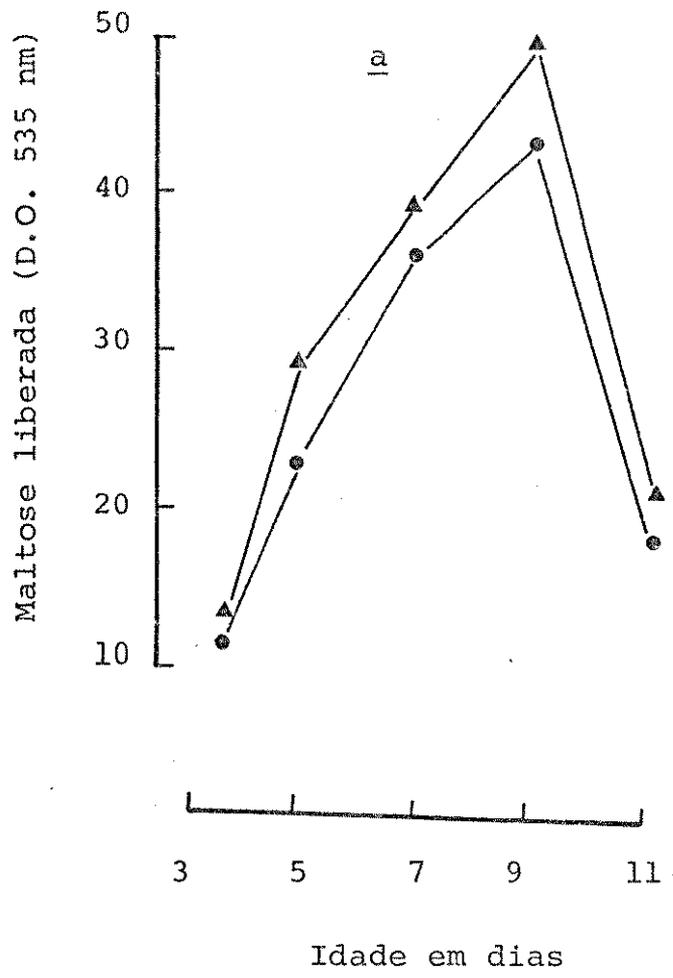
FIGURA 35



IDADE EM DIAS

FIGURA 36. Atividade amilolítica (a) e proteolítica (b) em extratos de cotilédones de plantas de feijão controle (●) ou tratadas com benziladenina (▲). Cada valor representa a média de 6 cotilédones.

FIGURA 36



ácidos livres em cotilédones e embriões de plantas tratadas com benziladenina 10^{-4} M, ou em plantas controle.

As figuras 37a-b-c mostram respectivamente os dados para peso fresco de embriões e cotilédones e peso seco de embriões durante o desenvolvimento das plantas.

Observa-se na figura 37b que, durante o período de degradação das reservas, os cotilédones de plantas tratadas com benziladenina apresentaram maior peso fresco que cotilédones controle. Os embriões de plantas tratadas (fig. 37a - 37c), no entanto, apresentaram pesos fresco e seco menores que embriões de plantas controle, refletindo um retardamento na translocação dos materiais de reserva dos cotilédones para o embrião.

A figura 38a mostra os resultados da análise da atividade amilolítica total dos cotilédones durante o desenvolvimento da planta, observando-se que sob tratamento benziladenina estes cotilédones apresentaram maior atividade amilolítica que os controles. Entretanto em ambos os casos o padrão de desenvolvimento da atividade amilolítica foi semelhante, alcançando máxima atividade no 7º dia de crescimento.

A atividade de β amilases, observada na figura 38b, permaneceu constante durante todo o período analisado, tanto nos cotilédones controle como nos tratados. Portanto, as modificações anteriormente observadas na atividade amilolítica total (fig. 38a) foram devidas apenas às alterações na atividade de α amilases. A atividade de β amilases em termos totais foi pequena, sendo em plantas controle 1,5 vezes menor e em plantas tratadas 2,5 vezes menor que a atividade de α amilases no pico da atividade amilolítica. Pela figura 38c, onde tem-se apenas a atividade de α amilase nota-se que esta atividade só é igual ou maior que a de β amilase após o 5º dia de crescimento para o controle e após o 4º dia de crescimento para tratamento com benziladenina, sugerindo maior síntese de α amilases sob tratamento de benziladenina.

O desenvolvimento da atividade proteolítica é mostrado na figura 39a, onde observa-se que houve aumento contínuo na atividade de proteases até o 7º dia de crescimento, quando então começou a decrescer até o final do experimento, sendo este padrão de desenvolvimento semelhante ao observado no experimento anterior. Entretanto, neste experimento não houve diferenças

FIGURA 37. Peso fresco de embriões (a), peso fresco de cotilédones (b) e peso seco de embriões (c) de plantas de feijão controle (●) ou tratadas com benziladennina (▲). Cada ponto representa a média de 10 valores.

FIGURA 37

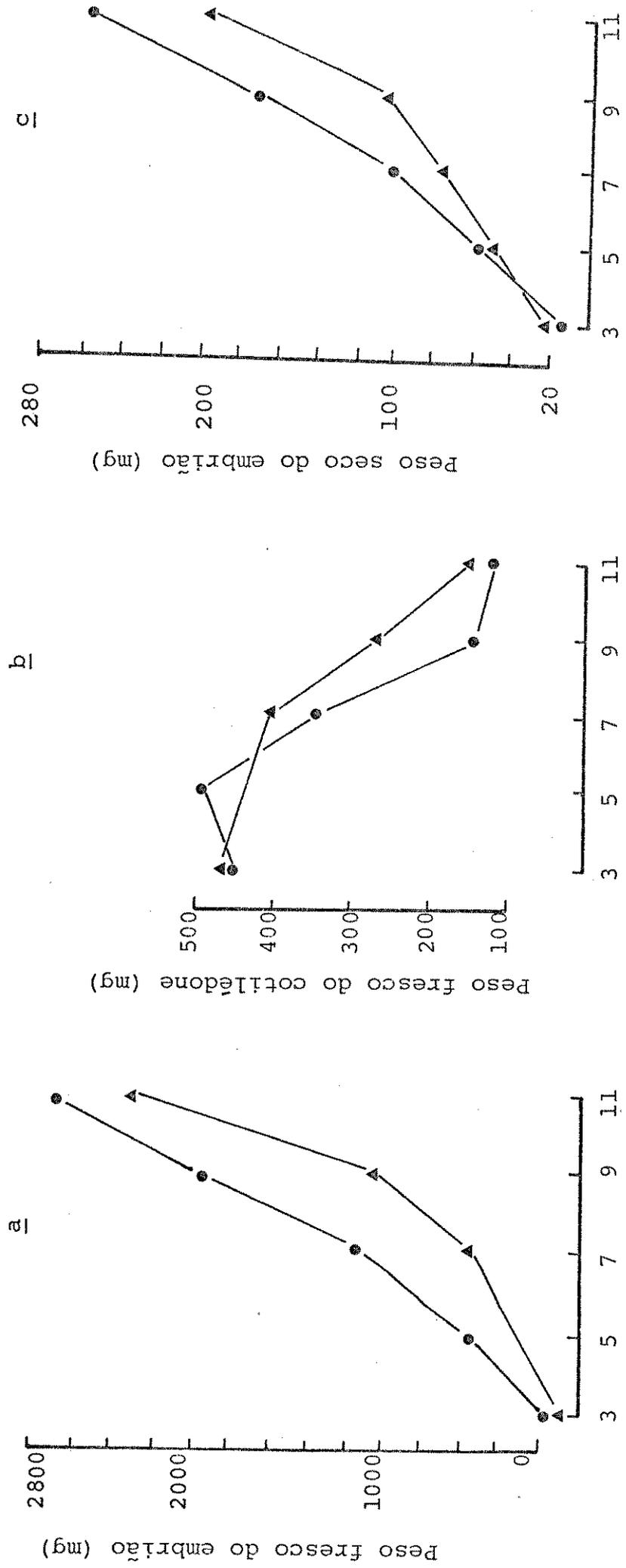
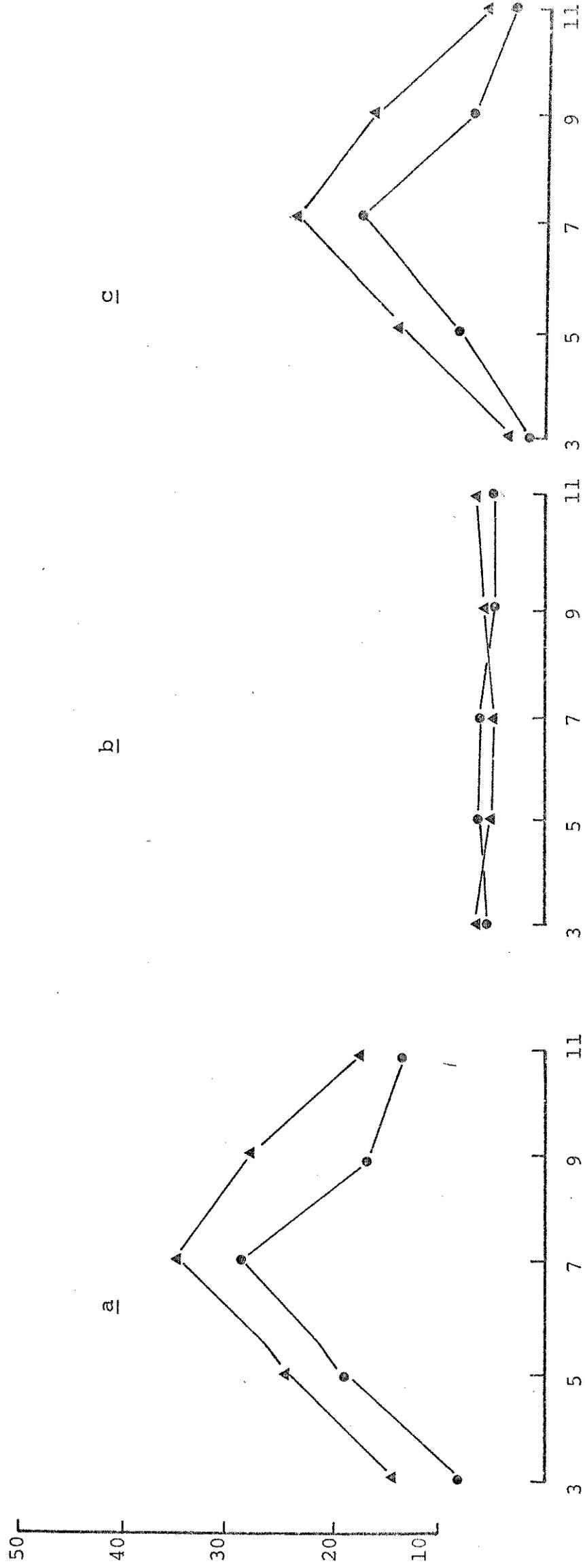


FIGURA 38. Atividade total de amilases (a), de β amilases (b) e de α amilases (c) de extratos de cotilédones controle (•) ou tratados com benziladenina (Δ). Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 38



Idade em dias

significativas na atividade proteolítica de cotilédones controle ou sob tratamento de benziladenina, com exceção do 9º dia de crescimento onde esta atividade permaneceu alta em cotilédones tratados.

As alterações no nível de aminoácidos livres em cotilédones e embriões de plantas controle ou tratadas com benziladenina são mostradas nas figuras 39b-c. Observa-se que em cotilédones (fig. 39b), tanto nos controles como naqueles tratados, o nível de aminoácidos livres diminuiu durante o crescimento da planta, atingindo um valor mínimo no 11º dia de crescimento. Entre o 3º e 7º dias o nível de aminoácidos livres foi maior em cotilédones controle que naqueles tratados com benziladenina. Em embriões o nível de aminoácidos livres (fig. 39c) tanto no controle como sob tratamento de benziladenina (sendo menor com benziladenina), sofreu um aumento seguido por um decréscimo, alcançando um nível máximo no 5º dia de crescimento para o controle e dois dias mais tarde, no 7º dia, para os tratados.

As figuras 40a-b-c-d mostram os resultados de análise do nível de açúcares livres em cotilédones e embriões de plantas controle ou tratadas com benziladenina. O nível do açúcar livre no cotilédone (fig. 40a) teve um aumento até o 7º dia de crescimento, começando a decrescer após este período até o final do experimento. Como já notado para aminoácidos livres, parece que a taxa de translocação de açúcares livres foi menor em plantas tratadas, fazendo com que no 9º dia de crescimento os cotilédones ainda apresentassem altos níveis de açúcares livres. Isto pode ser observado com maior clareza na figura 40b onde tem-se μg de açúcar livre/mg de peso fresco do cotilédone. Em embriões (fig. 40c) o nível de açúcares livres aumentou continuamente do 3º para o 11º dia, para o controle e até o 9º dia para tratamento de benziladenina. Na figura 40d é mostrada a concentração de açúcar livre no embrião. Novamente foi verificado um atraso na utilização de açúcar livre em plantas tratadas. Assim, em termos relativos, em embriões, a concentração de açúcar livre no controle começou a diminuir depois do 3º dia, enquanto que em plantas tratadas isto só ocorreu após o 9º dia de crescimento.

FIGURA 39a Atividade proteolítica em cotilédones de plantas de feijão controle (●) ou tratadas com benziladenina (▲). Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 39b-c Conteúdo de aminoácido livre (µg de ácido aspártico em cotilédones (b) e embriões (c) de plantas de feijão controle (●) ou tratadas com benziladenina (▲). Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 39

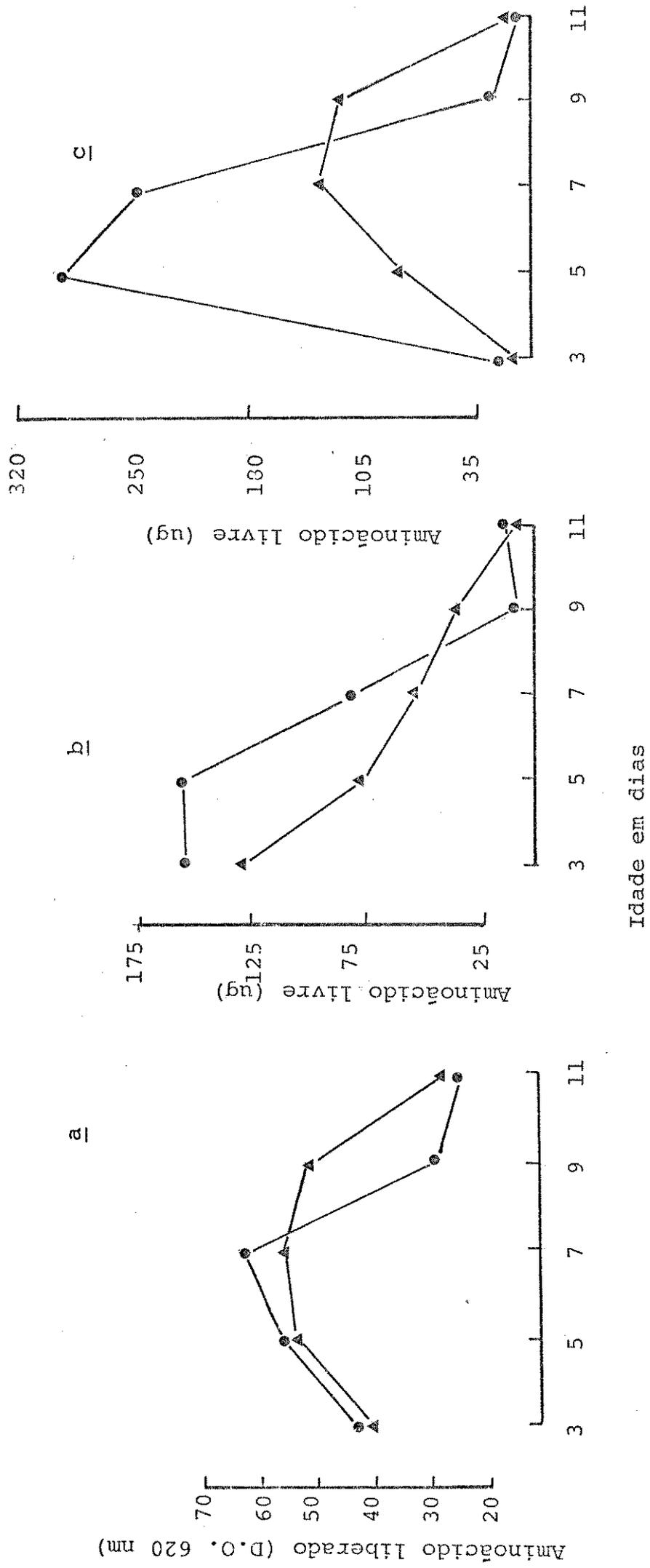
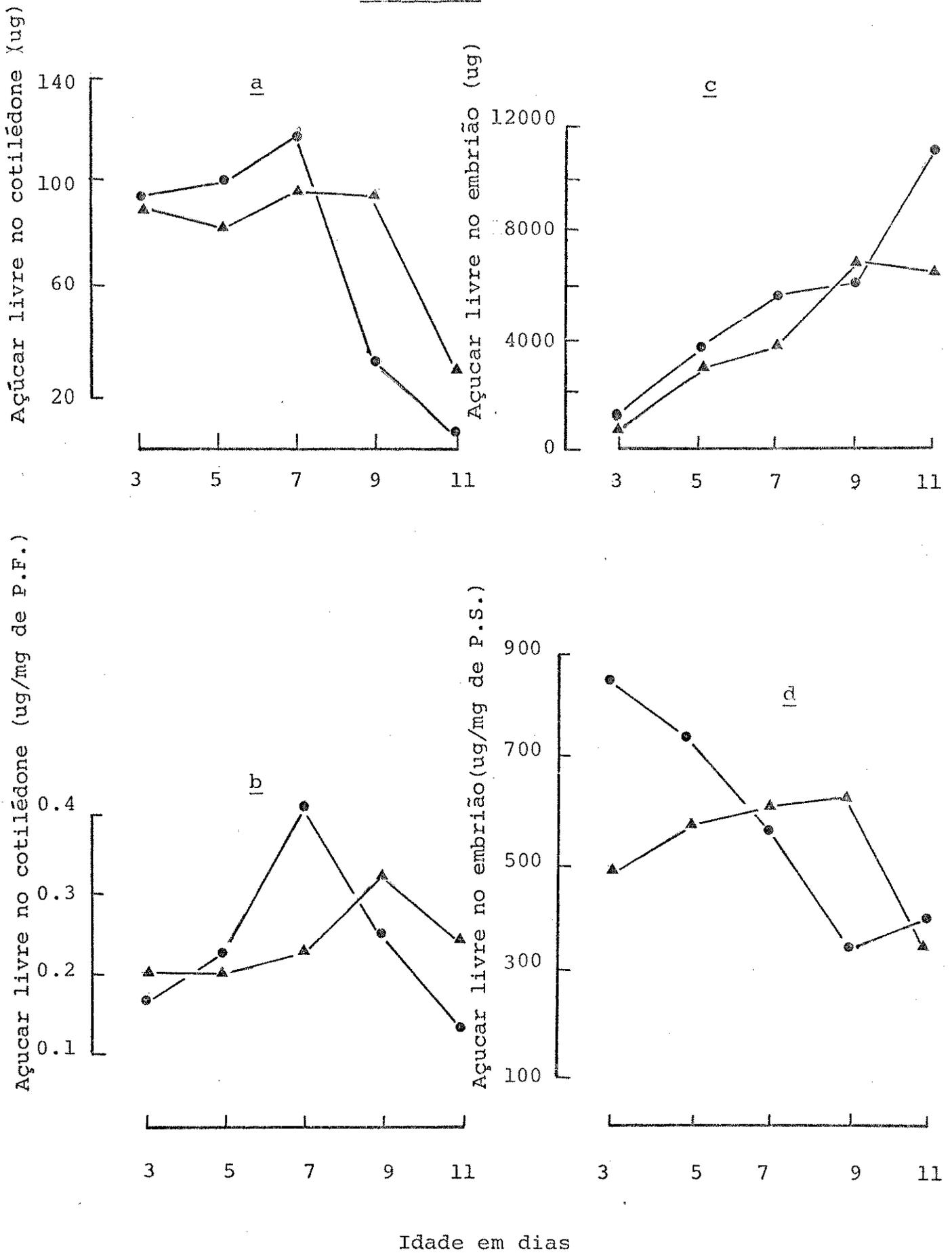


FIGURA 40. Conteúdo em açúcar livre em cotilédones (a) em embriões (b) de plantas controle (●) ou tratadas com benziladenina (▲). Concentração de açúcar livre (μg de açúcar/mg de tecido fresco) em cotilédones (c) e embriões (d) de plantas controle (●) ou tratadas com benziladenina (▲). Cada ponto representa a média de 6 valores.

FIGURA 40



5. Mudanças nos níveis endógenos de giberelinas e citocininas durante as primeiras horas de germinação

5a. Resultados preliminares

Das várias concentrações de ácido giberélico testadas para a obtenção de uma curva padrão para a dosagem de giberelinas em bioensaios, ficou estabelecido que concentrações entre 0,0325 e 1,0 ppm apresentavam uma linearidade na resposta de crescimento dos hipocótilos de alface (fig. 41a). Portanto, em experimentos futuros utilizou-se concentrações de 0,0312; 0,0625; 0,1; 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625 e 1,0 ppm de ácido giberélico na preparação da curva padrão.

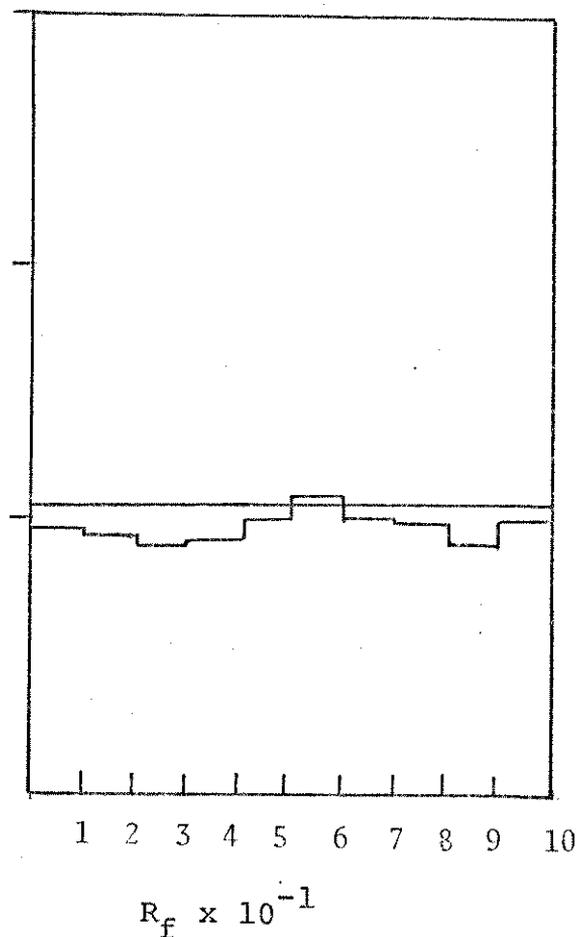
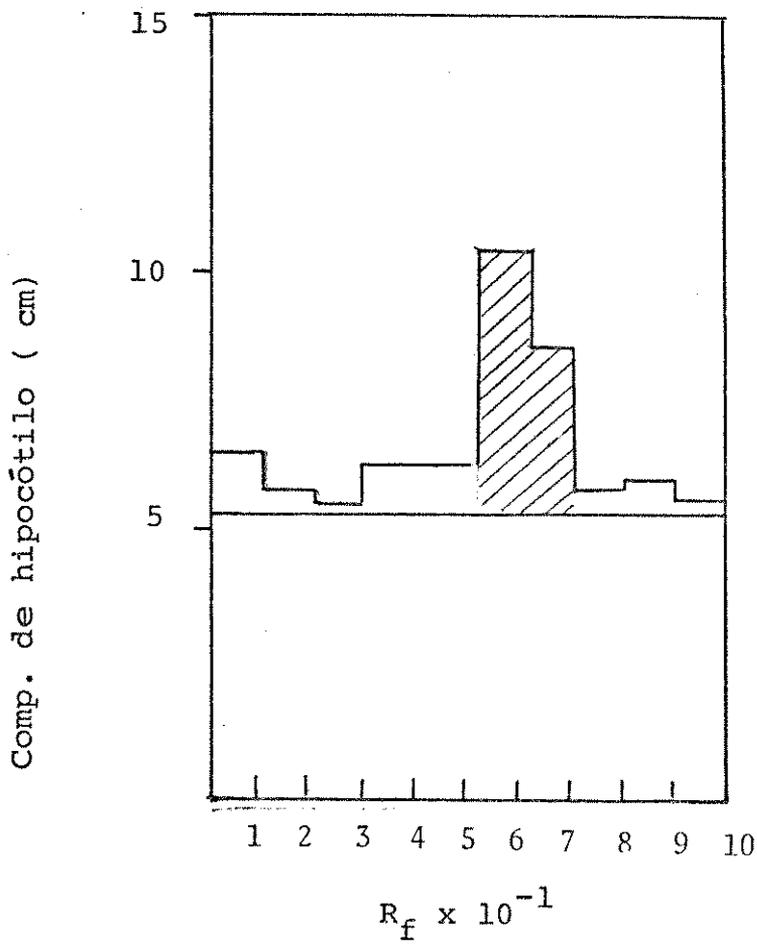
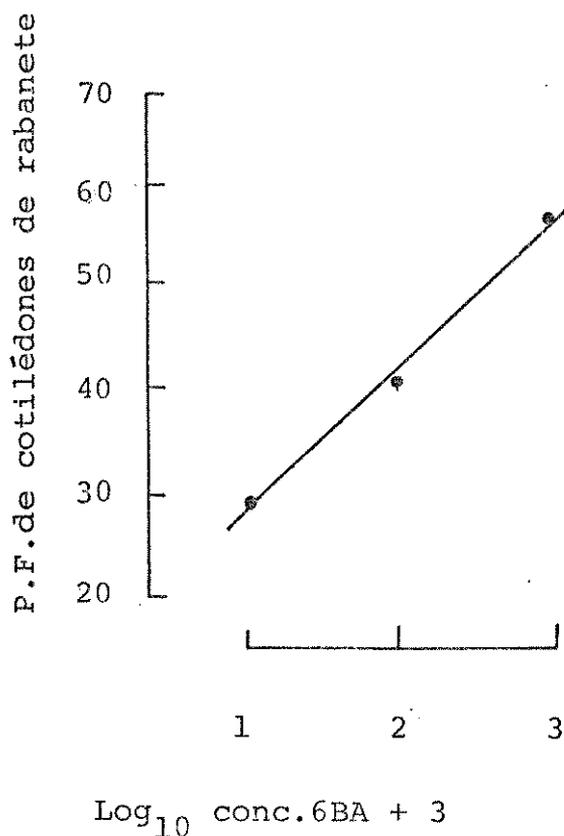
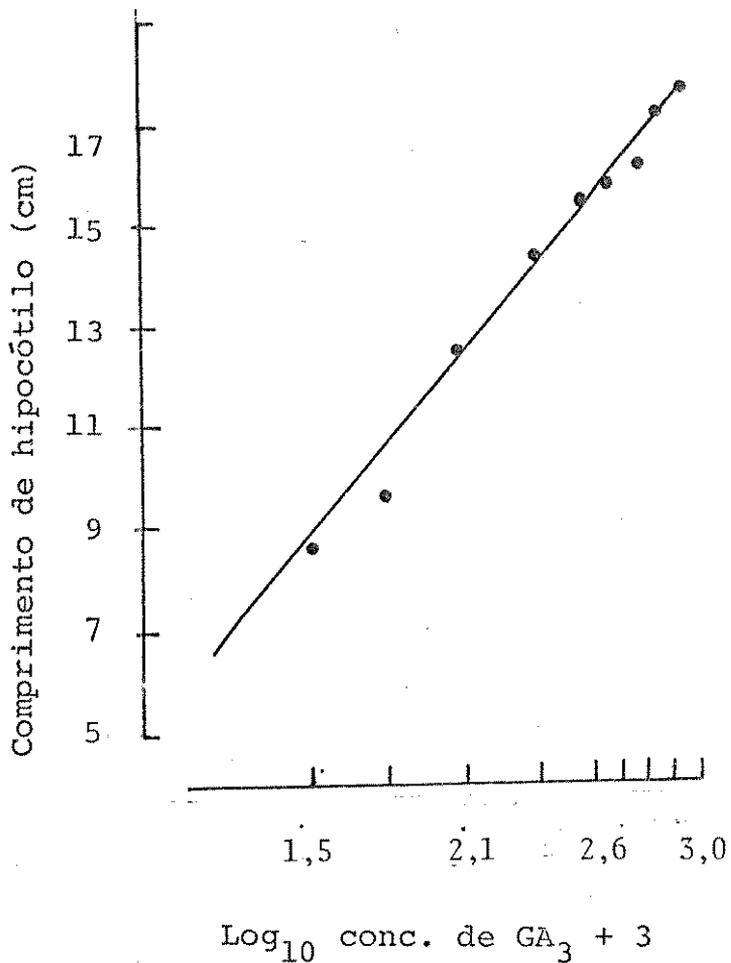
As concentrações de 6-benziladenina que deram respostas lineares ao aumento de peso fresco dos cotilédones de rabanete estavam entre 0,01 e 1,0 ppm, sendo portanto estas concentrações utilizadas para a dosagem de citocininas em bioensaios (fig. 41b).

A eficiência do método de recuperação de giberelinas após a extração foi testada através de fracionamento de soluções de ácido giberélico de concentração conhecida. Da fração ácida final obtida, uma alíquota contendo 0,5 g de ácido giberélico (caso não houvesse perdas) foi aplicada em papel de cromatografia. Simultaneamente foi corrido um cromatograma onde foi aplicado apenas acetato de etila. A figura 41c mostra que o cromatograma onde foi aplicado ácido giberélico apresentou picos de atividade giberelínica entre os Rfs 0,5 e 0,7, resultado este que foi confirmado em outros testes. Os cromatogramas controle (fig. 41d) não apresentaram efeito sobre o comprimento do hipocótilo de alface. Utilizando-se a curva padrão de ácido giberélico, quantificou-se os giberelinas presentes no cromatograma, encontrando-se 0,45 μg eq. a GA_3 . Isto representou uma recuperação de 90% da quantidade de ácido giberélico passada pelo método de fracionamento. Em outros testes a recuperação foi entre 80 a 95%, estabelecendo a eficiência do método na quantificação de giberelinas em amostras desconhecidas.

FIGURA 41a-b. Curvas-padrão de concentrações conhecidas de ácido giberélico (a) e de benziladenina (b)

FIGURA 41c-d. Atividade giberelínica em faixas de Rf de cromatogramas onde foi aplicada solução de ácido giberélico de concentração conhecida (c) ou onde foi aplicado apenas acetado de etila (d).

FIGURA 41



5b. Níveis endógenos de giberelinas e citocininas

Tendo sido estabelecidas a eficiência do método de fracionamento e a sensibilidade do bioteste de hipocótilo de alface para detecção de giberelinas em baixas concentrações, examinou-se o nível de giberelinas de sementes com 12 a 18 hs e com 16 a 28 hs de embebição.

O intuito destes primeiros experimentos foi o de fazer uma primeira detecção de giberelinas nestas sementes e ter-se a noção dos níveis destes hormônios no material. Os resultados destes testes são vistos nas figuras 42 e 43.

As giberelinas foram detectadas em todas as horas de embebição examinadas, embora tenham apresentado níveis absolutos diferentes nas várias horas. Assim nota-se, no primeiro experimento (fig. 42a), que o nível de giberelinas, inicialmente baixo, aumentou marcadamente de 12 para 18 horas. Entretanto, no segundo experimento (fig. 42b) nota-se que os picos de atividade giberelínica nos vários Rfs tenderam a uma diminuição com o tempo, sugerindo que durante o desenvolvimento o nível deste hormônio teve um aumento nas etapas iniciais de embebição da semente, decaindo mais tarde. Às 16 horas de embebição a distribuição de giberelinas pelos Rfs dos cromatogramas de dois experimentos distintos (apenas os resultados de um experimento são mostrados na figura 42) mostrou-se semelhante, ou seja, com um pico de atividade giberelínica entre a faixa de Rf 0,0 e 0,1 claramente separado de outro pico entre os Rfs 0,3 e 0,5. Deve ser ainda notado que às 12 horas a atividade giberelínica compreendia apenas a região entre os Rfs 0,7 e 0,8 abrangendo, porém, mais tarde também as regiões dos Rfs 0,0 a 0,2. Após 18 horas de embebição da semente, quando a atividade giberelínica começou a diminuir, houve redução da atividade giberelínica mais ao redor do Rf 0,6 que dos Rfs mais próximos da origem.

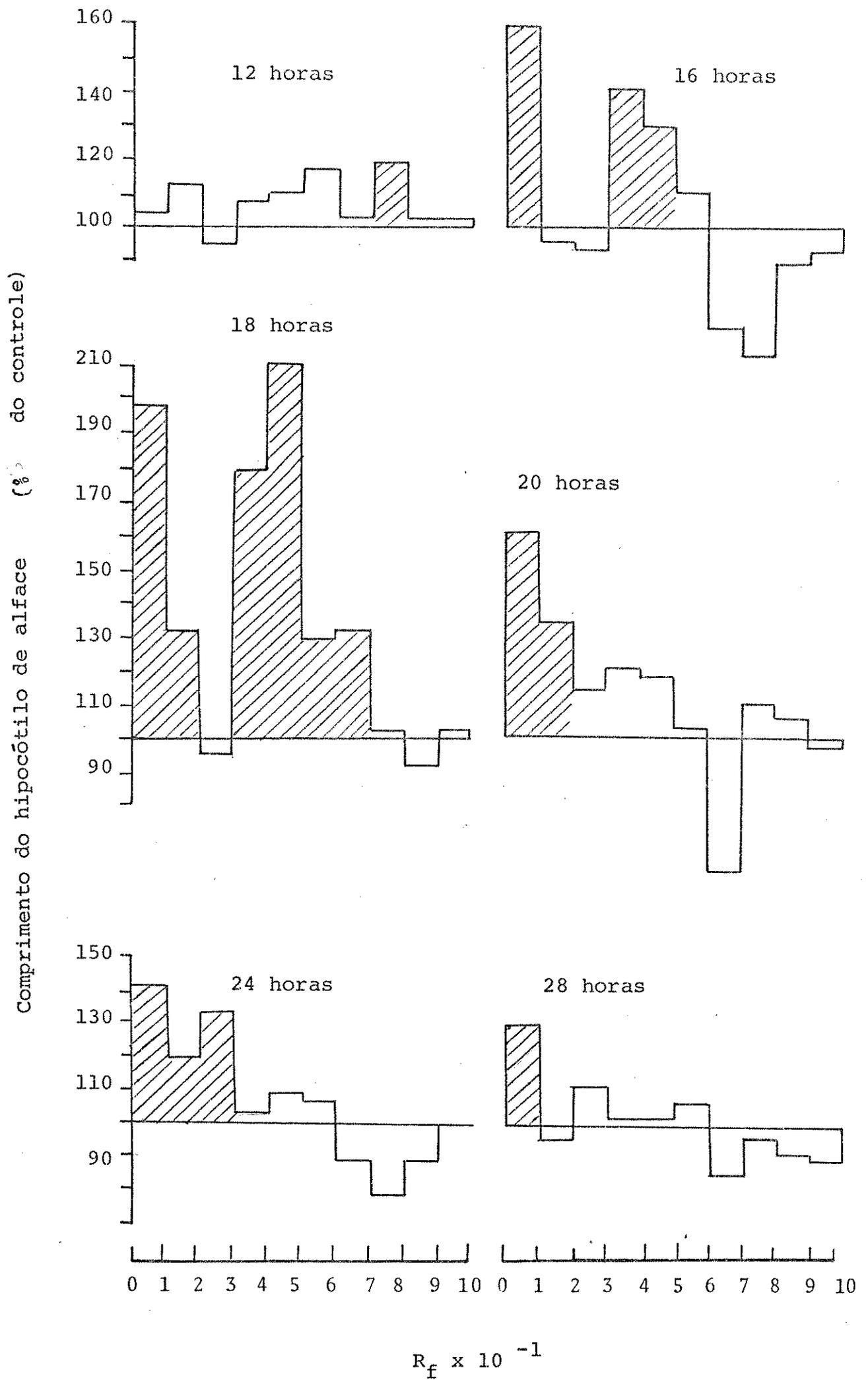
Concluiu-se destes dois experimentos preliminares que nas primeiras horas de embebição da semente há o aparecimento de dois grupos de giberelinas, um que aparece primeiro, apresentando maior mobilidade na cromatografia e outro, surgido mais tarde, de menor mobilidade. As giberelinas de maior mobilidade, embora tenham aparecido primeiro, foram as que desapareceram mais rápido.

FIGURA 42. Atividade giberelínica em extratos de 200 sementes de feijão embebidas por 12, 16, 18, 20, 24 e 28 horas.

a: embebição de 12 a 18h (1º exp.)

b: embebição de 20 a 28h (2º exp.).

FIGURA 42



O conteúdo de giberelinas nas diversas horas de embebição de semente é mostrado nas figuras 43a e 43b, onde os dados são apresentados em nanogramas e equivalentes a GA_3 /grama de peso fresco da semente. Pode ser visto que entre 12 e 18 horas o nível de giberelinas aumentou oito vezes, entretanto, após este período houve um decréscimo quase linear, de 16 para 28 horas, de 16ng/g de peso fresco para 3ng/g de peso fresco. Deve ser entretanto lembrado que o início do decréscimo deve ter ocorrido após 16 hs de embebição, uma vez que no experimento anterior (fig. 43a) foi mostrado um nível máximo de giberelinas às 18 hs de embebição.

Uma vez obtidos estes resultados analisou-se os níveis endógenos de giberelinas desde 6 até 30 horas de embebição da semente num único experimento. Os resultados são mostrados nas figuras 44 e 45.

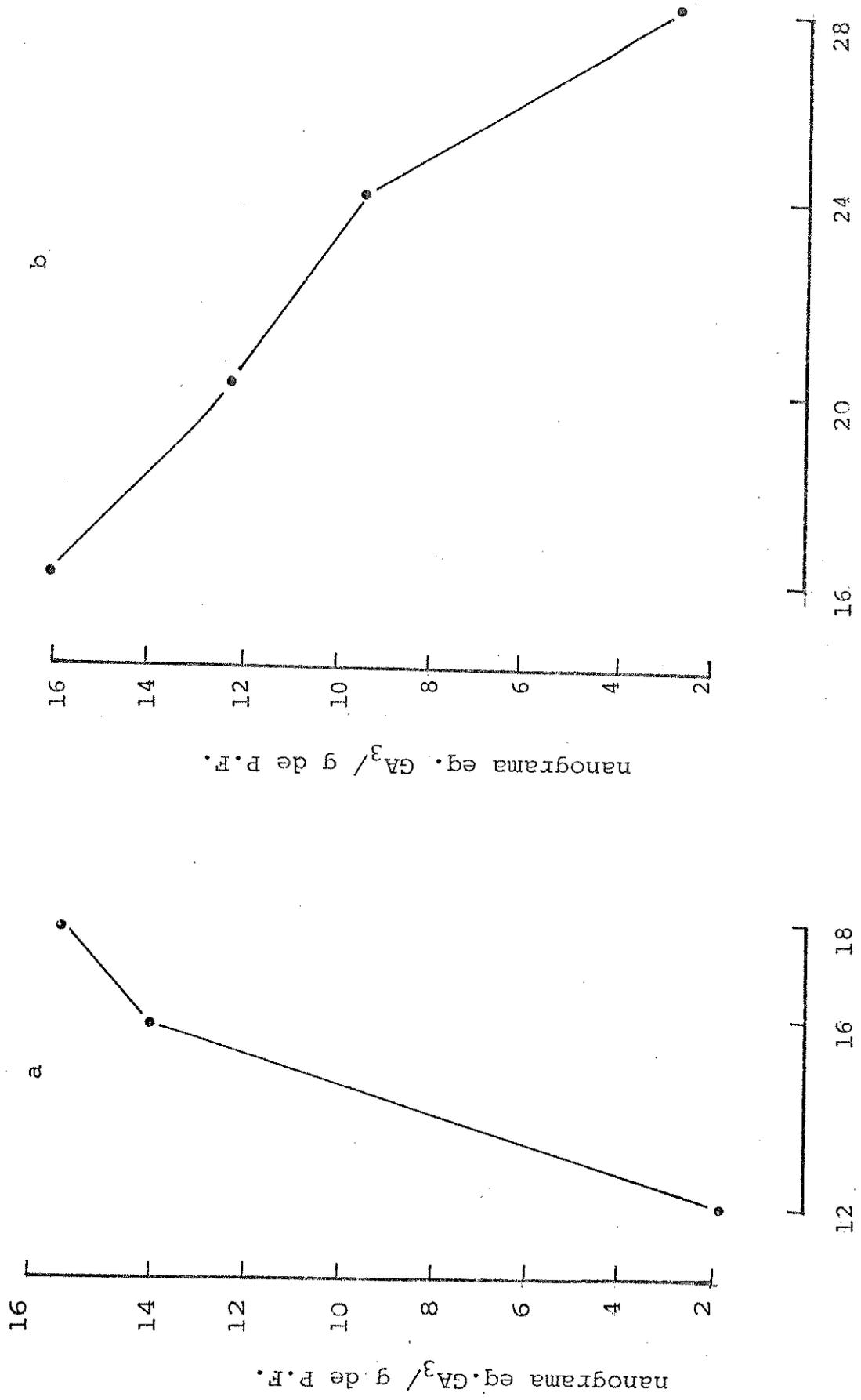
As mudanças qualitativas e quantitativas nos níveis endógenos de giberelinas anteriormente observados foram novamente verificados. Assim a primeira região de atividade no cromatograma referente a 6 horas de embebição da semente foi entre a faixa de Rf 0,5 e 0,6, aparecendo só mais tarde a atividade entre as faixas de Rfs 0,0 a 0,2. O pico máximo de atividade gibberelínica foi novamente ao redor de 18 horas, decaindo a atividade após este período. Novamente, as giberelinas apresentando maior mobilidade foram as primeiras a desaparecer. Estes dados corroboram o sugerido no experimento anterior de que no início da germinação o conteúdo total de giberelinas aumenta, decrescendo posteriormente, havendo, provavelmente, dois grupos de giberelinas envolvidos.

O conteúdo de giberelinas é mostrado na figura 45. Pode ser observado que entre 6 e 18 horas houve um aumento linear na quantidade de giberelinas, seguido por um decréscimo até 27 horas, permanecendo o nível constante até 30 horas.

Os níveis endógenos de citocininas foram verificados sendo utilizadas sementes com 3, 15 e 29 horas de embebição. Pode ser visto pela figura 46 que nas três idades testadas foi encontrada atividade citocinínica, sendo o padrão quantitativo semelhante àquele observado para giberelinas, havendo um aumento no nível de citocininas de 3 até 15 horas, sendo que às 29 horas de embebição o nível já era inferior ao inicial. Infelizmente,

FIGURA 43. Nível de giberelinas (nanograma equivalente a GA_3 / grama de peso fresco da semente) em sementes de feijão com diferentes tempos de embebição. a e b são dois experimentos distintos.

FIGURA 43



HORAS DE EMBEBIÇÃO

FIGURA 44. Atividade giberelínica em extratos de 200 sementes de feijão embebidas por 6, 12, 15, 18 24 e 27 horas.

FIGURA 44

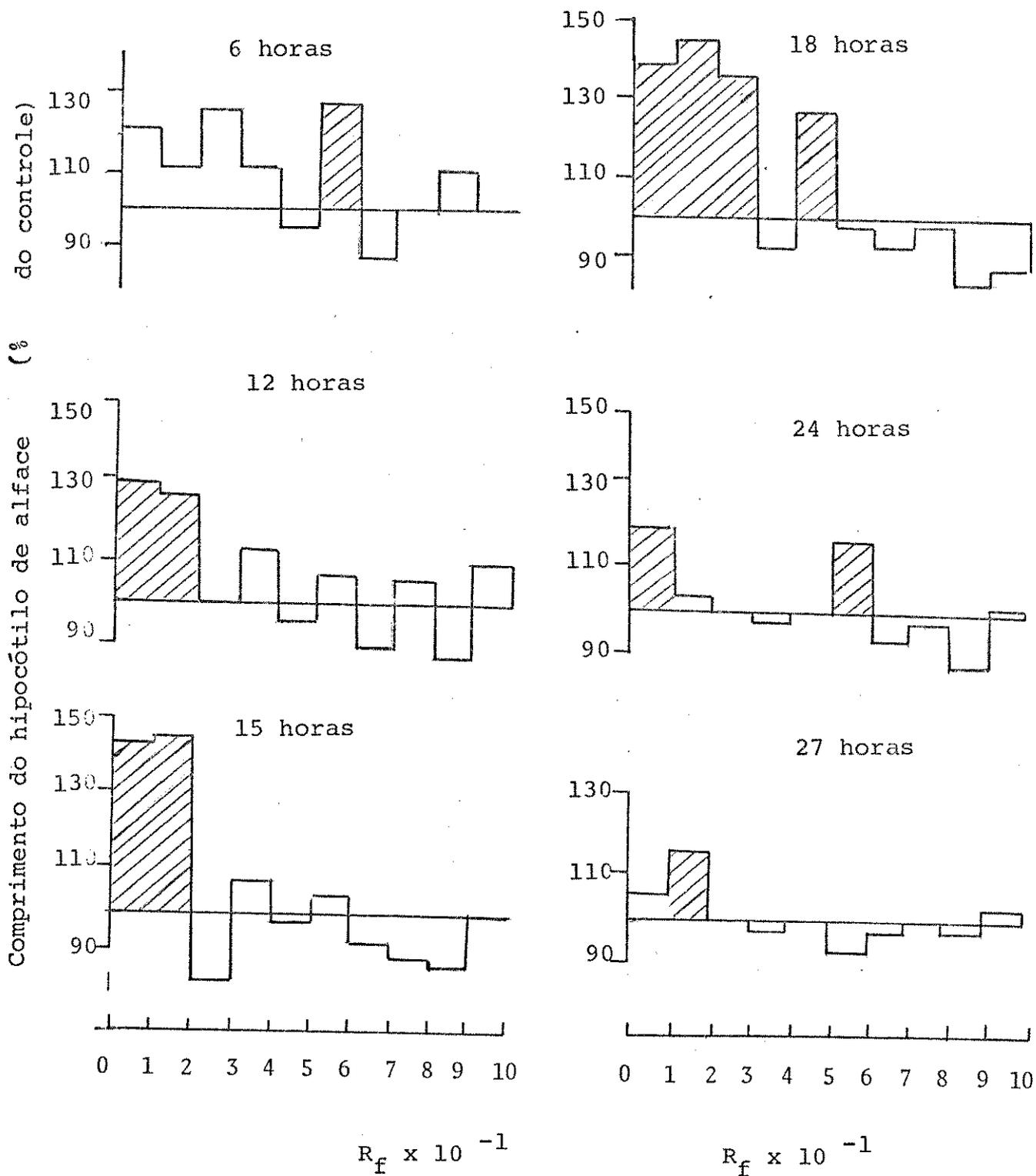


FIGURA 45. Nível de giberelinas (nanograma equivalente a GA₃/ grama de peso fresco da semente) em sementes de feijão com diferentes tempos de embebição.

FIGURA 45

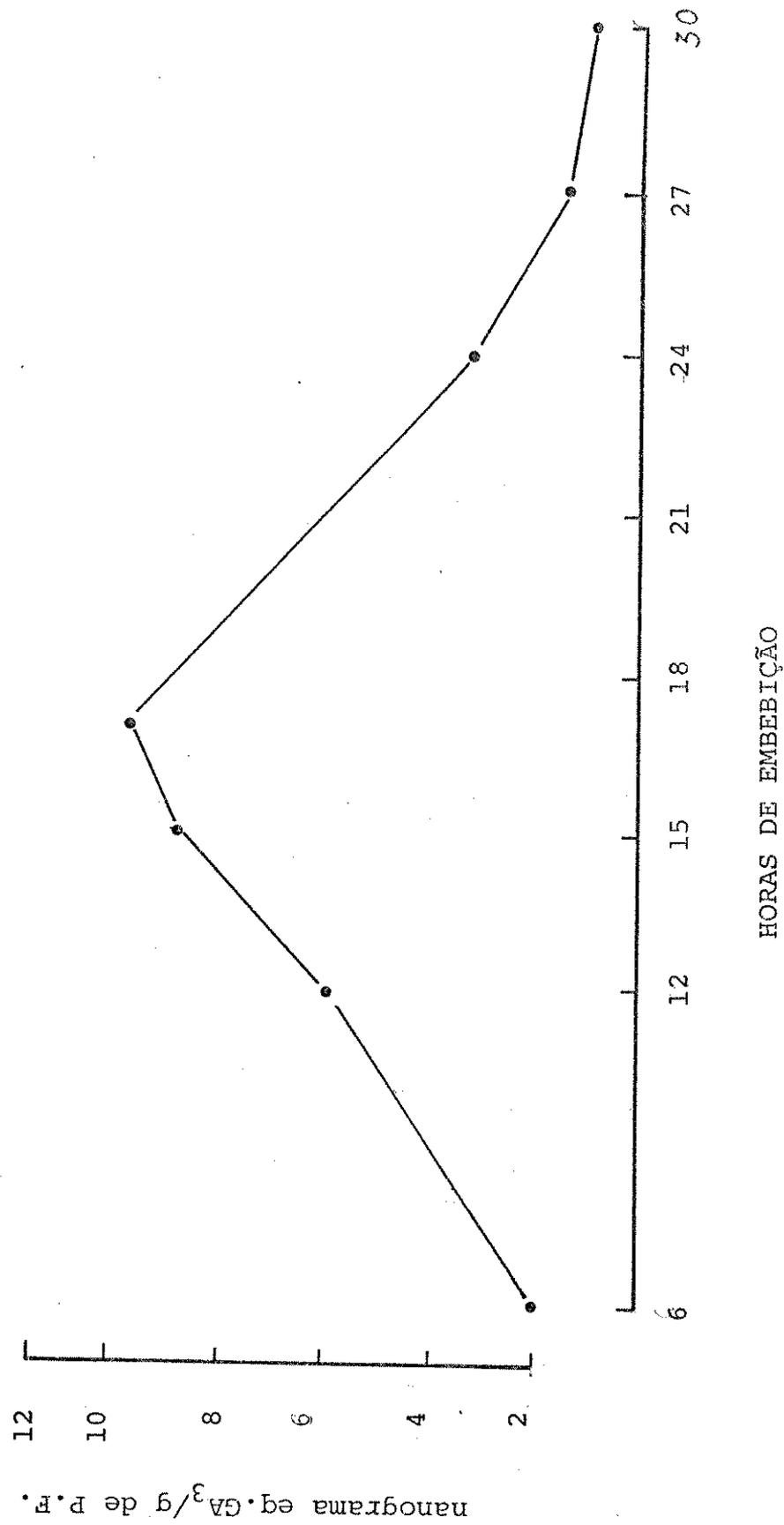
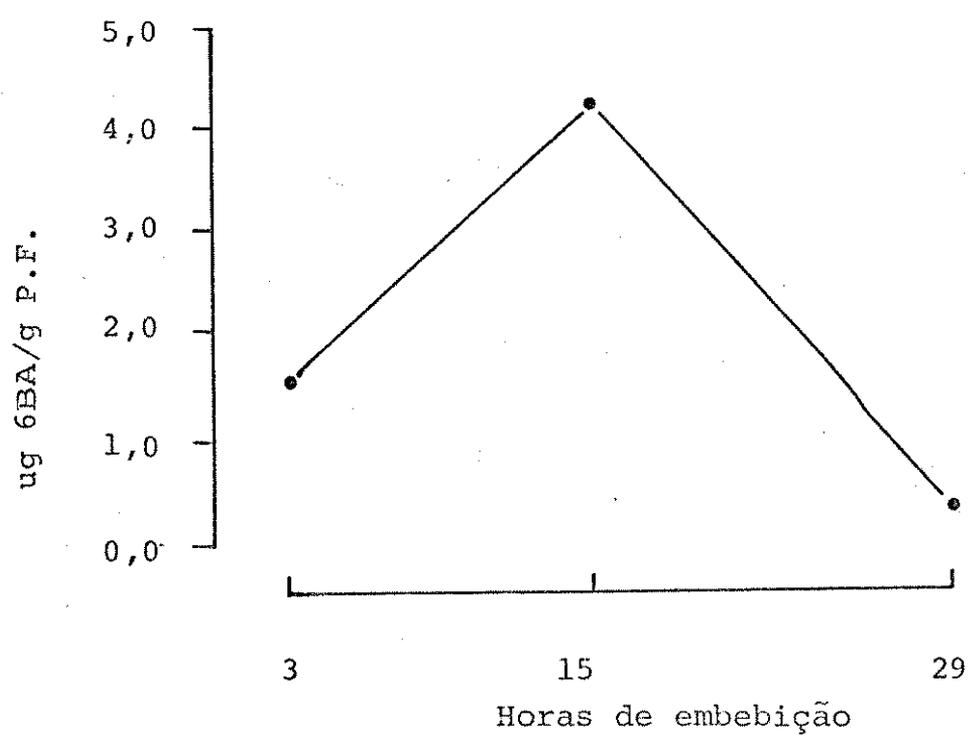
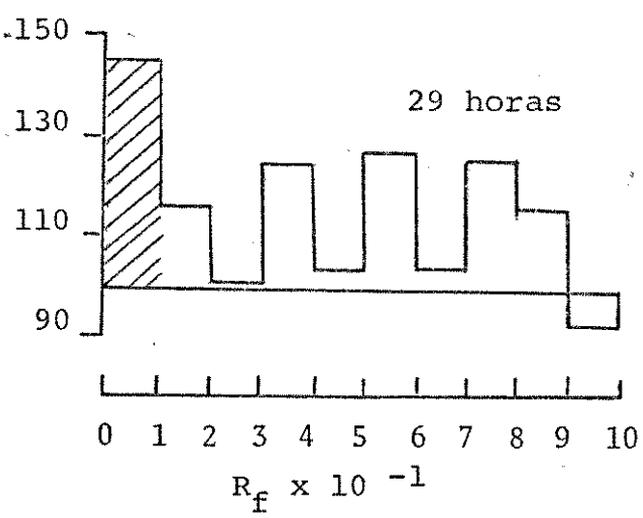
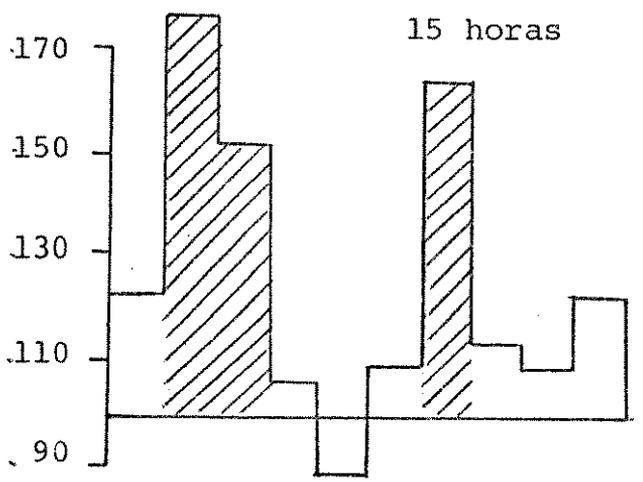
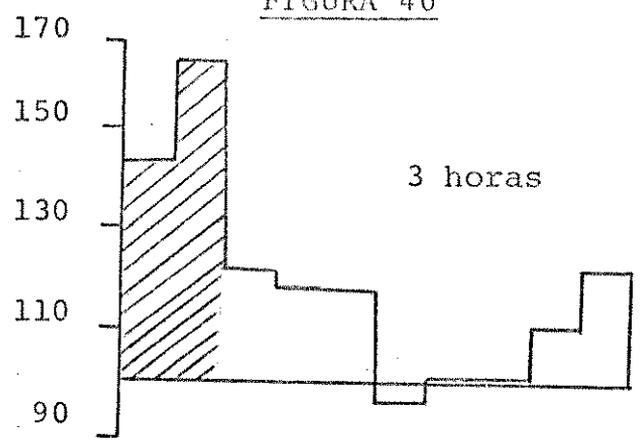


FIGURA 46 a-b-c Atividade citocinínica em extratos de 200 sementes de feijão embebidas por 3, 15 e 29 horas.

FIGURA 46d. Nível de citocininas (micrograma equivalente a 6BA/grama de peso fresco da semente) em semente de feijão com diferentes tempos de embebição.

FIGURA 46

Peso Fresco de cotilédones de rabanete (% do controle)



pelas poucas idades testadas, não ficou bem estabelecido onde realmente ocorreu o pico máximo de atividade citocinínica. Notou-se também que às 15 horas houve o aparecimento de um novo pico de atividade citocinínica, de mobilidade mais alta.

Estes dados estabelecem que tanto giberelinas como citocininas estão presentes nos estágios iniciais da germinação da semente, mostrando mudanças de níveis durante este período. Estes dados juntamente com os achados anteriores com relação ao tratamento de benziladenina sobre a mobilização de reservas e sobre a atividade enzimática, sugerem que as citocininas talvez possam controlar a hidrólise das reservas em sementes de feijão em germinação.

DISCUSSÃO

Uma vez obtidos dados sobre o crescimento inicial de feijão, seus níveis endógenos de giberelinas e citocininas e a influência do ácido giberélico e benziladenina exógenos sobre a hidrólise e utilização das reservas cotiledonares, pode-se, então, tentar compreender os processos ocorridos durante as primeiras etapas do crescimento de planta e o envolvimento de hormônios vegetais durante este período.

Foi observado que sementes maduras, quando em contato com a água, sofrem uma rápida hidratação durante as primeiras 28 hs de embebição, tendo este processo ocorrido em duas fases: uma mais rápida, até 4 hs e outra mais lenta, até 28 hs (fig 4a e 4b). A entrada de água durante a embebição da semente pode se dar uniformemente por toda a casca, mas é sabido que no caso de Phaseolus a absorção inicial de água ocorre através da micropila. A embebição da maioria das sementes mostra três fases típicas (Bewley e Black, 1978), embora neste trabalho só tenham sido visíveis as duas primeiras fases. A primeira fase, que neste caso se deu entre 0 e 4 hs, é dependente de processos físicos, sendo controlada por fatores ambientais como temperatura e composição química da semente. Simon e Meany (1965) observaram que, em Phaseolus, houve maior absorção de água a 24°C que a 15°C. Também foi verificado para várias outras sementes que com elevação da temperatura a embebição da semente se torna mais rápida (Bewley e Black, 1978). Em cevada foi observado que grãos mais ricos em proteínas absorvem água mais rapidamente que grãos mais pobres (Métivier, 1975). Estes mesmos resultados também foram encontrados para milho (Lopes e Grabe, 1971). A segunda fase de embebição da semente, que neste caso se deu entre 4 e 28 hs, é caracterizada por um período em que não há aumento em peso fresco, uma vez que a absorção física de água pela semente atingiu um equilíbrio osmótico. Sementes dormentes ou mortas mantêm este nível de hidratação, sementes viáveis, entretanto, quando em condições favoráveis entram na terceira

fase de embebição, que é caracterizada por uma absorção metabólica de água e é geralmente associada com a germinação visível.

Simon e Meany (1965) também encontraram um rápido aumento no conteúdo de água, durante a embebição de sementes de Phaseolus, que eles atribuíram principalmente à embebição dos cotilédones, já que a absorção de água pelo eixo embrionário foi quase insignificante em relação à absorção total de água pela semente. Este fato também foi encontrado em cevada (Brown, 1943, 1972). Entretanto o eixo, por seu pequeno tamanho e por ser um tecido rico em proteínas, tem suas células hidratadas antes que as do tecido de reserva, podendo, portanto, certos processos metabólicos serem iniciados no tecido embrionário.

Embora o aumento em peso fresco da semente tenha sido rápido nas primeiras horas de embebição a 25°C, o eixo só começou a aumentar em peso seco após as 20 hs (fig. 5a e 5b). Estes dados, para Phaseolus, também foram encontrados por Simon e Meany (1965) à temperatura de 24°C, no entanto, foi verificado que a 15°C o início do crescimento do eixo só ocorreu por volta de 52 hs. Estes autores atribuíram o crescimento inicial do eixo ao crescimento da radícula, uma vez que a plúmula só começou a aumentar em peso por volta de 32hs. Em milho também foi notado que, nas raízes, a mitose e a respectiva síntese de DNA ocorreu cerca de 40 hs antes do início destes processos no caule (Stain e Quastler, 1963). Em outras leguminosas, como ervilha, o início do crescimento do eixo também ocorreu por volta de 20 hs, entretanto em cereais, como cevada, este fato só ocorreu após 48 hs de embebição do grão (Brown, 1972).

Observa-se, então, que embora o eixo embrionário seja logo hidratado, há uma demora entre esta hidratação e o início de seu crescimento em peso seco. Simon e Meany (1965) tentaram verificar se o controle deste crescimento poderia ser dado pelo teor de água no tecido embrionário, mas estes autores concluíram que esta hipótese não poderia ser viável, sendo mais provável um envolvimento hormonal no controle deste fenômeno. Atualmente existem evidências de que neste período de demora há a síntese de hormônios, ou a liberação destes de uma forma inativa para a ativa no eixo embrionário (McComb, 1961; Macleod e Palmer, 1967; Radley, 1967, 1969; Van Staden, 1973). Estes hor

mônios são translocados para o tecido de reserva, onde em muitos casos eles controlam a síntese de enzimas hidrolíticas, as quais fornecerão ao eixo carbono e nitrogênio, através da degradação das principais reservas da semente, amido e proteína. Em cevada, o hormônio mais importante envolvido nestes processos é o ácido giberélico, enquanto que em dicotiledôneas parece que há também o envolvimento de citocininas (Paleg, 1960; Macleod e Millar, 1962; Varner e Chandra, 1964; Sprent, 1968a; Gepstain e Ilan, 1970; Briggs, 1972; Vigil e Ruddat, 1973).

Mesmo antes da fase de maior degradação das reservas, os hormônios são sintetizados no eixo embrionário, sendo responsáveis pelas etapas de seu desenvolvimento. Assim em cevada após 5 hs de embebição do grão, auxinas são sintetizadas e parecem ter um papel importante na organização do sistema vascular entre o embrião e o escutelo, o qual seria utilizado mais tarde para a translocação de giberelinas sintetizadas no eixo embrionário.

Parece provável, então, que esta fase de demora entre a embebição da semente e o início do crescimento do eixo represente o tempo mínimo necessário para a reativação de sistemas respiratórios pré-existentes (Ching, 1972) e para a síntese ou liberação e translocação de hormônios até o seu sítio de ação. Nesta fase inicial de embebição, antes do crescimento do eixo, o suprimento de nutrientes para a síntese de enzimas é dado pelas próprias reservas do embrião, como acontece em cevada, onde rafinose e sacarose estocadas no eixo são rapidamente respiradas ou utilizadas na síntese de novas paredes celulares (Bewley e Black, 1978). Em milho, lipídios estocados no escutelo são rapidamente degradados para o fornecimento de energia nas etapas iniciais de crescimento, antes de haver a hidrólise das reservas do endosperma (Dure, 1960). Ingle, Beevers e Haelgman (1964), também trabalhando com milho, notaram que embora não haja crescimento do eixo durante as primeiras 23 horas de embebição, há a solubilização de 17% do peso seco total do grão, indicando que muitos processos metabólicos já se iniciam antes do crescimento visível do eixo. Da mesma forma, em ervilha o alongamento da radícula durante as etapas iniciais de germinação não necessita de reservas cotiledonares, mas utiliza lipídios e proteína estocados no próprio eixo embrionário.

Nos experimentos de medidas de respiração (fig. 6,7 e 8) não foi possível detectar trocas gasosas em sementes secas, indicando que a respiração neste período deva ser extremamente baixa. Vários trabalhos, onde estes dados tentaram ser estabelecidos, foram criticados no passado, uma vez que a respiração detectada poderia ter sido devida à respiração de microorganismos presentes na casca da semente (Beevers, 1976). Entretanto, logo após a primeira hora de embebição já foi possível detectar a absorção de oxigênio pela semente (fig. 6), corroborando os dados de Opik e Simon (1963) para feijão e de Brown (1943) para cevada, que também detectaram absorção de oxigênio pela semente logo após o contato desta com a água. Até 56 horas de embebição da semente, período em que foi medida a respiração da semente, a taxa de absorção de oxigênio aumentou continuamente, sendo mais rápida até 24 hs de embebição, caindo para um valor reduzido durante as restantes 28 horas (fig. 7 e 8). Este padrão de respiração, nos primeiros dias de germinação, também foi observado por Opik e Simon (1963) em Phaseolus, e por Folkes e Yemm (1958) em cevada. Esta taxa mais rápida durante as primeiras 20 horas de embebição reflete, provavelmente, a reativação de sistemas respiratórios durante a hidratação, acompanhada pela hidrólise das reservas do tecido embrionário (Ching, 1972). Foi demonstrado que no tecido embrionário de Phaseolus vulgaris há ao redor de 0,8 mg de açúcar solúvel que pode ser utilizado para o fornecimento de energia durante as etapas iniciais do crescimento do eixo, além de que os cotilédones contêm cerca de 80 mg de açúcar solúvel, 50% sacarose e 50% estaquiose, que podem ser translocados ao eixo mesmo antes da hidrólise de amido do tecido de reserva, que só tem início após o aparecimento de amilase (Yomo e Varner, 1973). Simon e Meany (1965) atribuíram a respiração no início da embebição da semente à utilização destes produtos.

Foi notado pela respiração de embriões isolados que, por volta de 40 horas, a respiração destes equivaleu a 45% da respiração total da semente, mostrando que o tecido embrionário é relativamente mais ativo que o tecido de reserva. Entretanto, deve-se tomar cuidado na interpretação destes dados, uma vez que embriões isolados podem ter uma taxa respiratória diferente daquela de embriões em sementes intactas. Tanto assim que Brown

(1972) mostrou que a soma da respiração de embriões e endospermas isolados eram maiores que a respiração de sementes intactas. Em adição, Folkes, Willis e Yemm (1951) mostraram que a taxa respiratória é um pouco aumentada em tecidos isolados, principalmente em embriões.

Em resumo ficou estabelecido que durante as primeiras horas de embebição da semente de feijão há uma rápida hidratação do tecido, seguida por uma fase estacionária na absorção de água, período este em que seriam ativados os sistemas enzimáticos respiratórios pré-existentes. Ao redor de 20 horas, quando os níveis de citocininas e giberelinas são altos (fig. 44 e 45), as condições já permitem um aumento em peso seco pelo embrião, indicando o início da incorporação do material de reserva cotiledonar.

A análise do crescimento inicial da planta (fig 9 a 12) mostrou um aumento contínuo no peso seco do eixo embrionário que, durante os primeiros sete dias foi acompanhado por um decréscimo no peso seco dos cotilédones.

O decréscimo no peso seco total observado nas etapas iniciais do crescimento (figs. 9, 15 e 16a), devido a utilização de substratos respiratórios, foi suplantado após o 7º dia pela fixação de carbono das folhas primárias recém-expandidas, contribuindo com isso para o aumento em peso seco total. Embora os cotilédones, em plantas de germinação epígea como o feijão, também possam contribuir para a fixação de carbono (Young e Varner, 1959; Larson e Beevers, 1965), são as primeiras folhas, na verdade, os principais órgãos responsáveis pelo suprimento de carbono à planta em desenvolvimento (Dale, 1972; Felipe e Dale, 1973, 1975), tanto assim que o impedimento do desenvolvimento normal destas folhas podem prejudicar irreversivelmente o desenvolvimento da planta (Dale e Felipe, 1972a,b; Métivier, 1979). Em Phaseolus vulgaris, ainda no embrião, as folhas são relativamente grandes em comparação ao restante do eixo embrionário, já apresentando sua forma final, com seu sistema de nervuras bem desenvolvido. Em condições favoráveis estas folhas podem atingir tamanho considerável, chegando a representar um terço da área foliar final da planta (Dale, 1964). Estes dados mostram sua importância como componente fotossintético da planta. A área foliar e o peso fresco da folha tiveram um aumento contí-

nuo até o 17º dia, sendo estes dois parâmetros fortemente correlacionados (fig. 10). Mesmo após o término das reservas cotiledonares as folhas continuaram seu crescimento, indicando que elas utilizaram nutrição de sua própria fotossíntese, a qual pode atingir taxas máximas mesmo antes da folha atingir seu tamanho máximo final (Hopkinson, 1964; Viana e Métivier, 1980). Houve também um aumento contínuo no conteúdo de clorofila e proteína durante este período, tendo este aumento ocorrido em duas fases distintas: uma mais rápida até o 8º dia e outra mais lenta até que a folha atingisse seu tamanho máximo final. O conteúdo de clorofila e proteína foliar foram fortemente correlacionados. As folhas além de apresentarem maior peso seco que as raízes, também apresentaram maior conteúdo em proteína (fig. 14b e tab. 2), sendo, talvez, a maior parte desta proteína ribulosebifosfato-carboxilase, uma enzima correlacionada com a fotossíntese foliar (Kawashima e Wildman, 1970; Blenkinsop e Dale, 1974; Métivier e Dale, 1977b). Assim parece que as reservas cotiledonares, nas etapas iniciais do crescimento, são importantes para o estabelecimento de uma planta autotrófica, apresentando uma área foliar relativamente grande que propicie à planta altas taxas de fotossíntese.

Na fase de crescimento em que as reservas cotiledonares estão sendo utilizadas, verificou-se uma perda de peso dos cotilédones, acompanhado por um ganho em peso concomitante pelo eixo. Esta fase é tipicamente caracterizada pela mobilização de reservas dos cotilédones para o eixo embrionário, tanto em relação à matéria seca (Folkes, Willis e Yemm, 1952; Prisco, Ainouz e Mello, 1975; Métivier e Dale, 1977a) como em relação à proteína (Beevers e Guernsey, 1966; Guardiola e Sutcliffe, 1971). Esta correlação entre a mobilização de reservas e o crescimento do eixo levou muitos pesquisadores a assumirem que a degradação das reservas poderia ser controlada pelo eixo embrionário.

Nos primeiros e últimos dias de mobilização de reservas a taxa da translocação dos cotilédones para o eixo foi menor, mas entre os dias 4 e 6 foram observadas as maiores taxas de translocação, equivalendo a 1/6 do peso inicial da semente por dia. Desta forma, o eixo embrionário que representava menos de 2% do peso seco total da semente, passou a representar, por volta do 6º dia, quase a metade do peso seco total da semente. Es-

te padrão de translocação foi encontrado tanto em leguminosas como Pisum sativum (Beevers, 1968), Vigna sinensis (Prisco et al., 1975) como também em monocotiledôneas: cevada (Métivier e Dale, 1977a) e milho (Monteiro, 1979). Entre os dias 2 e 6 a perda de peso pelos cotilédones foi maior que o correspondente ganho em peso pelo eixo (tab. 2a), indicando que uma parte considerável do material hidrolisado foi respirado, desta forma não sendo incorporado pelo eixo e que também houve uma demora na incorporação pelo eixo embrionário do material de reserva degradado. O primeiro ponto já tinha sido demonstrado pela queda no peso seco total até o 7º dia de crescimento (fig. 11 a 13). Evidências para o segundo ponto foram demonstradas pelo acúmulo de aminoácidos livres e açúcares livres nos cotilédones (fig. 39 e 40), acompanhado pela atividade de enzimas hidrolíticas durante o mesmo período. Após o 6º dia, quando a degradação das reservas cotiledonares já ocorria mais lentamente, o ganho de peso eixo foi maior que nos dias anteriores, este fato podendo ser devido tanto à utilização de reservas previamente hidrolisadas, como também devido a um novo suprimento de carbono dado pela fotossíntese das folhas primárias, que nesta fase estavam em rápida expansão (figs. 11 a 13).

A análise de reservas protéicas (fig. 14 e tab. 2b) mostrou que sua translocação dos cotilédones para o eixo se deu numa taxa mais alta que aquela observada para translocação de matéria seca. Este fato foi também observado em cevada (Métivier, e Dale, 1977a) e em milho (Monteiro, 1979), onde, para estes autores, a diferença na taxa de translocação entre proteínas e matéria seca foi atribuída a um desbalanceamento na proporção de nitrogênio e carboidratos nos grãos de cereais. Assim, a translocação mais rápida de nitrogênio teve o fim de suprir o embrião mais em nitrogênio que em carboidratos, levando a um balanço mais favorável entre estes dois componentes durante os primeiros dias de crescimento. Em um estudo em grãos de cevada com alto e baixo teores em nitrogênio, foi demonstrado que grãos mais pobres mostraram uma taxa de absorção de nitrogênio exógeno muito mais alta, conseguindo, desta forma, restabelecer o equilíbrio entre nitrogênio e carboidratos na plântula. Também grãos com baixo teor de nitrogênio, na ausência de suprimento exógeno, não foram capazes de utilizar os carboidratos de sua

reserva tão eficientemente como aqueles com alto teor de nitrogênio endógeno, ou fornecido exogenamente (Métivier, 1975). Mesmo em leguminosas, onde o teor de nitrogênio é comparativamente maior que em grãos de cereais, a hidrólise de proteínas foi mais rápida que a de matéria seca, como foi visto em Pisum (Beevers e Guernsey, 1966), em Vicia (Prisco et al., 1975) e neste presente trabalho em Phaseolus. Este fato pode ser confirmado pela comparação entre o cruzamento das curvas de conteúdo protéico de eixo e dos cotilédones e o cruzamento das curvas de peso seco do eixo e dos cotilédones (figs. 14a e 14b), que no primeiro caso se dá entre os dias 3 e 4 e no segundo, entre os dias 6 e 7, havendo, portanto uma defasagem de 2 dias entre os dois pontos de cruzamento. O cruzamento destas curvas representa o ponto em que, aproximadamente, 50% das reservas translocáveis dos cotilédones foram transpostas ao eixo, uma vez que neste ponto o conteúdo de proteína ou de matéria seca é o mesmo tanto para cotilédones como para o eixo.

A utilização mais rápida de proteína que de matéria seca também foi comprovada pela análise da taxa de translocação das reservas (tab. 2a e 2b), onde verificou-se que a maior taxa de translocação de proteínas se deu entre os dias 2 e 4, enquanto que para matéria seca isto só ocorreu entre os dias 4 e 6. Como resultado destes fatos, entre o 6º e o 9º dias, a quantidade de proteína translocada dos cotilédones foi pequena, enquanto que a quantidade de matéria seca translocada ainda alcançou um valor considerável. Dados semelhantes foram encontrados em cevada (Folkes, Willis e Yemm, 1951; Métivier e Dale, 1977a), em ervilha (Beevers, 1968) e em milho (Monteiro, 1979). A taxa de translocação de proteínas dos cotilédones e a taxa de incorporação destas pelo eixo não foram correspondentes, durante o período analisado, refletindo uma defasagem entre a degradação de proteínas e sua incorporação pelo eixo.

A distribuição das reservas cotiledonares não se deu igualmente entre parte aérea e raiz, sendo que a primeira sempre apresentou maior conteúdo tanto em proteína como em matéria seca. Entretanto a diferença foi marcadamente maior em relação a distribuição de proteínas, isto sendo reflexo do alto conteúdo de ribulose bifosfato carboxilase, principalmente nas folhas (Blenkinsop e Dale, 1974).

Os efeitos de tratamento com ácido giberélico e benziladenina foram marcantes e distintos. No primeiro caso (fig. 15 e tab. 3) as plantas tornaram-se alongadas, sendo o aumento na altura total promovido tanto pelo crescimento do epicótilo como do hipocótilo, embora o epicótilo tenha mostrado maior aumento de crescimento, cerca de 300% em relação ao controle. Este grande aumento no alongamento do caule foi seguido por uma diminuição de sua espessura (tab. 3d), as plantas apresentando um aspecto mais frágil. O alongamento provocado pelo ácido giberélico, atualmente conhecido como um dos efeitos mais marcantes deste hormônio, foi originalmente observado em arroz, fato este que levou à descoberta das giberelinas. Este efeito de alongamento é ainda observado em uma grande variedade de plantas como Stevia rebaudiana (Valio e Rocha, 1976), cana de açúcar, repolho, alface, cenoura, pepino (Weaver, 1972) e feijão (Felippe, Boschini, Amabis e Rossi, 1971). Mais recentemente, Valio e Schwabe (1978) mostraram estiolamento em caule de feijão, tendo o epicótilo sofrido maior aumento que o hipocótilo. Também foi encontrado por estes autores e por Pereira (1978) uma redução na área foliar de plantas de Phaseolus vulgaris sob tratamento com ácido giberélico, confirmando os dados obtidos neste trabalho, onde além de redução na área, as folhas também apresentaram menor peso fresco e seco (fig. 15d e tabs. 3e, 4 e 5). Entretanto estes foram os únicos órgãos a apresentarem diferenças significativas em peso, em relação ao controle. Desta maneira, parece que os efeitos de morfologia externa vistos não foram necessariamente correlacionados com a distribuição de reservas cotiledonares, sendo que a diminuição em peso observada pelas folhas foi mais devida ao efeito deste tratamento na redução da área fotossintética da folha, diminuindo sua produção em carboidratos.

Os efeitos provocados pelo tratamento de benziladenina quanto à morfologia externa foram, em geral, contrários àqueles provocados pelo tratamento de ácido giberélico. Os caules se tornaram mais curtos e mais grossos, tanto em termos de epicótilo como de hipocótilo, sendo novamente o efeito mais marcante no epicótilo (fig. 16, tab. 3d). Este efeito de tratamento de benziladenina sobre a redução e espessamento do caule também foi encontrado por Juliano e Varner (1969). Outros autores,

usando cinetina, verificaram este mesmo efeito, onde caules de ervilha tiveram seu alongamento inibido e um alargamento de seu diâmetro (Brian e Hemming, 1957; Katsumi, 1962). O espessamento de caule também foi observado em girassol (Roppe, 1956) e este parece ser um efeito geral para citocinina, a qual promove o crescimento radial das células vegetais, provocando um aumento de peso fresco. Desta forma, os tecidos vegetais mais sensíveis a este efeito, como cotilédones de rabanete, podem servir de detectores da presença de citocininas em bioensaios (Lethan, 1968).

Quanto à distribuição de matéria seca o tratamento de benziladenina provocou uma redução de peso fresco e seco em folhas e raízes, e um aumento no peso fresco e seco de cotilédones (tabs. 4 e 5). A diminuição de peso em raízes e folhas e o aumento de peso nos cotilédones sugerem que talvez tenha havido menor translocação de reservas nas plantas tratadas, tanto assim que quando as reservas cotiledonares de plantas controle já tinham sido esgotadas, as plantas tratadas ainda apresentavam considerável conteúdo em matéria seca. Resultado similar foi encontrado por Juliano e Varner (1969), em ervilha, onde sob tratamento de benziladenina houve um atraso na translocação de amido dos cotilédones. Este efeito provocado pelo tratamento de benziladenina poderia ser explicado por duas hipóteses. Primeiro, o tratamento de benziladenina poderia agir diretamente na ação ou síntese de amilases, enzimas responsáveis pela degradação do amido; em segundo lugar, este tratamento poderia inibir, por outros caminhos, o crescimento geral do eixo embrionário, diminuindo a fonte de consumo e assim diminuindo a demanda de carboidratos pelo eixo. Se assim fosse, os efeitos provocados pelo tratamento de benziladenina (tabs. 4 e 5) seriam consequência de um efeito tóxico dado pelas altas concentrações aplicadas, onde a inibição do crescimento de folhas e raízes levou a uma diminuição na taxa de degradação das reservas. Juliano e Varner (1969) mostraram que sementes embebidas em benziladenina mostraram um retardamento no crescimento, menor degradação de reservas e menor produção de enzimas que o controle, sendo estes efeitos similares àqueles provocados por substâncias inibidoras do crescimento normal, como o cloranfenicol e cicloheximida.

A análise do conteúdo protéico dos vários órgãos da planta (tabs. 6a e 6b) mostrou que o tratamento de ácido giberélico, como visto no caso para matéria seca, não afetou a distribuição de proteína. A análise em mais detalhe das folhas mostrou um aumento na concentração de proteína nestes órgãos, mas isto sendo devido à redução de área e peso foliar, sob este tratamento, levando, por este motivo, a um aumento na concentração de proteínas. Estes dados sugerem que embora o tratamento de ácido giberélico tenha mostrado um grande efeito sobre a morfologia externa, ele não afeta a distribuição de proteína ou de matéria seca, uma vez que, em relação ao controle, a mesma quantidade destes componentes foi translocada para cada órgão da planta.

Sob tratamento de benziladenina, entretanto, as folhas e raízes tiveram diminuído seu teor em proteína, isto sendo acompanhado por um aumento no conteúdo de proteínas dos cotilédones. As folhas, apesar de apresentarem menor quantidade de proteína que as folhas de plantas controle, tiveram maior concentração de proteína que estas, uma vez que sob tratamento de benziladenina elas sofreram uma acentuada redução em peso e em área (tab. 6c). Apesar dos conteúdos de clorofila e proteína serem fortemente correlacionados em plantas normais, sob tratamento de benziladenina apenas o teor de clorofila sofreu aumento. Este fato foi também verificado por Van Onckelen, Caubergs e De Greef (1977). Este aumento no conteúdo de clorofila sob tratamento de citocininas tinha já sido anteriormente verificado por Richmond e Lang (1957), onde folhas destacadas, sob este tratamento, permaneciam verdes por um maior espaço de tempo. Entretanto, neste caso, o fenômeno estava mais associado a um retardamento da senescência que a um aumento na síntese de clorofila.

Em resumo estes dados estabeleceram que os efeitos de tratamento de ácido giberélico e benziladenina foram bem distintos. O primeiro tratamento parece afetar apenas a morfologia externa da planta, sendo a distribuição de matéria seca e protéica similar àquela vista para plantas controle, com exceção das folhas que tiveram seu peso seco diminuído, mas isto sendo causado pela redução concomitante da área fotossintética. Entretanto, sob tratamento de benziladenina, além de haver modificações na morfologia externa da planta houve também alterações

na distribuição de matéria seca e proteína, tendo as folhas e raízes menor teor destes componentes que plantas controle, enquanto que nos cotilédones estes níveis foram aumentados. A diminuição do conteúdo de matéria seca nas folhas foi provavelmente devido tanto à menor degradação das reservas cotiledonares como a menor fixação de carbono.

O exame dos métodos para a medida de atividade enzimática de amilase e protease (figs 19 e 20) mostrou que os métodos de dosagem dos produtos formados, maltose e tirosina respectivamente, foram eficientes e sensíveis para a detecção de mudanças na atividade destas enzimas hidrolíticas. Considerando, em primeiro lugar, o método de dosagem de amilases foi verificado que os extratos de cotilédones de feijão apresentaram alta atividade hidrolítica, a qual não foi diminuída durante o período de experimentação; que esta atividade aumentou linearmente com o tempo, com o volume de extrato e com o aumento de temperatura e que extratos fervidos não mostraram atividade enzimática. Estes dados confirmaram a presença de amilases nos extratos de cotilédones de feijão. O pH ótimo para esta reação foi de 5,5, dado este também observado por French (1960) para a dosagem de amilase em soja.

Os mesmos parâmetros observados para a dosagem de atividade de amilases também foram observados para proteases. A maior diferença entre os métodos foi o tempo de reação. Beevers (1960, 1976) sugeriu que a reação proteolítica seria mais lenta que a amilolítica, uma vez que na primeira as enzimas responsáveis pela hidrólise seriam exoenzimas, exopeptidases, que só atacam cadeias terminais, ao passo que na reação amilolítica as enzimas responsáveis pela hidrólise seriam endoenzimas, a amilase, que degradam ligações internas. O método colorimétrico empregado para a dosagem de proteases mede a liberação de tirosina e triptofano (Lowry, Rosebrough, Farr e Handall, 1951). A dosagem de aminoácidos por absorbância a 280 nm foi criticada por Reervers (1968, 1976), uma vez que durante a reação são formadas outras substâncias que também absorvem no ultravioleta. O substrato mais satisfatório foi caseína em pH 5,5, dado este confirmado por Yomo e Srinivasan (1973) para feijão, por Guardiola e Sutcliffe (1971) em ervilha e por Prisco et al. (1975) em Vigna.

O papel dos hormônios no controle da degradação das reservas foi bem estudado nos anos de 1960 a 1970, em monocotiledôneas, particularmente em cevada onde foi demonstrado que o ácido giberélico era o hormônio responsável pela síntese e liberação de muitas enzimas hidrolíticas, sendo proveniente do embrião e translocado para a camada de aleurona nos primeiros dias de germinação (Varner e Chandra, 1964; Filner e Varner, 1967). Na ausência do embrião não ocorria a hidrólise do endosperma, sendo, portanto, a degradação das reservas completamente dependente da presença do embrião. Na presença de inibidores da síntese de proteína, mesmo na presença do embrião, não havia hidrólise das reservas, mostrando que muitas enzimas hidrolíticas eram sintetizadas "de novo" (Paleg, 1960; Varner, 1964; Briggs, 1968). Entretanto foi logo verificado que este modelo de degradação não era verdadeiro para outros cereais, como no caso de milho, onde a atividade de enzimas hidrolíticas não era dependente da presença do embrião e nem poderia ser aumentada pela adição do ácido giberélico (Harvey e Oaks, 1974; Goldstein e Jennings, 1975; Monteiro, 1979). Em aveia (Naylor, 1969) e em arroz (Palmiano e Juliano, 1972) também não foi evidente o papel de ácido giberélico no controle da degradação das reservas. Em adição, foi demonstrado que o ácido giberélico não é o único hormônio envolvido na degradação de reservas em cereais, como é o caso de trigo, onde as citocininas estão implicadas na hidrólise do amido (Eastwood, Tavener e Laidman, 1969) e uma auxina envolvida no metabolismo de lípidos da camada de aleurona (Bewley e Black, 1978).

Para dicotiledôneas o volume de trabalho sobre o controle da degradação das reservas é bem menor e bem menos detalhado que para cereais. A maioria dos trabalhos neste campo abrange dois aspectos: primeiro, onde são feitos experimentos com extratos ou difusatos de embriões, numa tentativa de se estabelecer a importância de substâncias provenientes do embrião sobre a degradação de reservas cotiledonares; o segundo tipo de trabalho feito é com relação ao efeito da aplicação de hormônios exógenos sobre a utilização de reservas, assumindo-se que se o hormônio aplicado em questão tem um efeito sobre a hidrólise das reservas, é razoável que ele endogenamente possa controlar este processo.

No presente trabalho a análise do controle da hidrólise

das reservas foi feita verificando-se tanto a influência do eixo embrionário, como o da aplicação de hormônios exógenos neste processo. Em adição, o nível de hormônios exógenos também foi verificado durante as etapas iniciais da germinação.

Na análise da influência do eixo sobre a hidrólise das reservas, os cotilédones de feijão foram isolados da semente ainda seca, evitando-se assim qualquer possível difusão de substâncias do eixo para os cotilédones durante a embebição. Nestes experimentos ficou estabelecido que a presença do embrião não foi absolutamente necessária para o início da degradação das reservas, embora na sua ausência a taxa de hidrólise tenha sido sensivelmente menor. Este ponto foi estabelecido tanto para a atividade amilolítica como proteolítica (figs. 26 e 29), entretanto para a atividade de proteases os efeitos do embrião foram bem menos nítidos.

Estes dados sugerem que para haver uma taxa máxima de hidrólise das reservas, a presença do embrião é necessária, ou para o fornecimento de hormônios que aumentam a atividade hidrolítica, ou agindo como fonte de consumo, aumentando a degradação de reservas por aumentar a demanda de nitrogênio e carboidratos. Mas, o efeito hormonal parece ser mais provável desde que somente uma pequena fração do embrião é capaz de provocar as mesmas taxas de degradação de reservas. Neste caso é evidente que esta pequena fração do embrião não seria uma fonte de consumo suficiente para controlar a hidrólise das reservas, como acontece com o embrião inteiro (Young, Huang, Vanecko, Marks e Varner, 1960; Scala, Patrick e Macbeth, 1969).

O fato de cotilédones destacados já apresentarem atividade amilolítica sugere que na semente seca poderia ou já existir um certo nível de hormônios, ou então já estarem presentes certas enzimas hidrolíticas. A presença de hormônios em sementes secas foi demonstrada por Radley (1958), Brian (1966), Koshimizu, Kusaki, Mitsui e Matsubara (1967), Parker e Lethan (1973) e Shyndy e Smith (1975).

A não necessidade do embrião para o início da hidrólise em cotilédones destacados de Phaseolus vulgaris, apesar de ser diferente do observado para cevada (Varner, 1964), concorda com os dados de Gepstain e Ilan (1970) e de Van Onckelan et al. (1977) para feijão e com os dados para outras dicotiledôneas como ervilha (Varner, Balce e Huang, 1963; Locker e Ilan, 1975),

abóbora (Penner e Ashton, 1967a,b; Wiley e Ashton, 1967; Sze e Ashton, 1971), algodão e girassol (Gilad, Ilan e Reinhold, 1970) e amendoim (Marcus e Feely, 1964). Estes dados também foram encontrados em sementes com reservas endospermáticas como Pinnus ponderosa e Pinnus silvestris (Nyman, 1971 e Bilderback, 1974), e Trigonella foenun-graecum (Reid e Meier, 1972).

Apesar de haver concordância em todos estes trabalhos da existência da atividade hidrolítica na ausência do embrião, o grau desta atividade em relação a sementes intactas é confusa; segundo Gepstain e Ilan (1970) e este presente trabalho a atividade foi menor; entretanto em trabalhos de Yomo e Varner (1973) foi encontrada promoção e Bewley e Black (1978) relataram que a atividade foi semelhante tanto na presença como na ausência do embrião.

Para a análise da influência de hormônios exógenos sobre a hidrólise de reservas, utilizou-se o ácido giberélico, uma gibberelina natural e o regulador de crescimento sintético benziladenina, uma substância de atividade citocinínica.

Foi visto que no caso do ácido giberélico, apesar deste hormônio ter mostrado efeito sobre a morfologia externa da planta, não houve alteração na atividade amilolítica (figs. 24 a 26) e nem na atividade proteolítica (fig. 28) em qualquer das concentrações testadas. Isto corrobora os dados de Gepstain e Ilan (1970) que não encontraram efeito promotor por este tratamento na atividade de amilases, mostrando, ao contrário, considerável inibição. Entretanto Van Onckelen et al. (1977) encontraram, em feijão, que o tratamento de ácido giberélico poderia reverter o efeito inibidor da luz branca na atividade de amilases, sugerindo que este hormônio poderia ter um possível envolvimento no controle de reservas. No entanto, em ervilha, Yomo e Varner (1973) demonstraram que o tratamento de ácido giberélico foi incapaz de reverter o efeito inibidor causado pela aplicação do ácido abscísico. Ainda para ervilha há vários outros dados, como os de Varner, Balce e Huang (1963), onde foi verificado que apesar do tratamento de ácido giberélico promover a atividade de amilases na ausência do embrião, esta atividade nunca foi tão alta como na presença deste. Estes dados, de certa forma, corroboram os dados de Gepstain e Ilan (1970) onde foi visto que apenas aplicação de ácido giberélico não poderia subs-

tituir o efeito do embrião na degradação de reservas amilolíticas, sendo necessário para isto a aplicação conjunta de ácido giberélico e citocininas. Entretanto Sprent (1960a,b) não encontrou efeito promotor de ácido giberélico sobre a atividade de amilases em cotilédones de ervilha. Estas diferenças encontradas entre estes trabalhos poderiam, talvez, ser reflexo de condições experimentais não homogêneas e da utilização de vários cultivares de ervilha. Em outras espécies examinadas, como em abóbora, mamona, algodão e maçã, o tratamento de ácido giberélico não teve influência na atividade de amilases, lipases e outras enzimas relacionadas com a degradação de reservas (Marriott e Northcote, 1975). De qualquer forma, mesmo quando encontrado um efeito de ácido giberélico sobre a atividade amilolítica, este efeito nunca foi tão marcante como o observado para cereais, tanto assim, que a maior promoção provocada pelo ácido giberélico sobre a atividade enzimática, até hoje vista, foi em Corylus avelana onde a atividade de isocitrato liase foi aumentada cinco vezes em relação ao controle (Pinfield, 1968). Este efeito é extremamente pequeno quando comparado com o aumento promovido por este tratamento na atividade de amilases em endospermas de-embrionados de cevada.

O tratamento de benziladenina, ao contrário do de ácido giberélico, teve efeito promotor tanto na atividade amilolítica (figs. 24, 29, 30, 32, 36 e tabs. 9, 12 e 13) como na atividade proteolítica (tab. 8), embora no último caso a promoção não tenha sido tão nítida como no caso de amilases. Foi demonstrado neste trabalho que, em cotilédones de-embrionados de feijão, o tratamento de benziladenina promoveu a atividade amilolítica a níveis iguais ou superiores àqueles dados pela presença do embrião, sugerindo que as citocininas possam estar envolvidas na hidrólise do amido. Gepstain e Ilan (1970) também encontraram, em cotilédones destacados de feijão, alta promoção da atividade amilolítica sob tratamento de cinetina. Em cotilédones de-embrionados de ervilha foi encontrada promoção da atividade amilolítica tanto sob tratamento de benziladenina como de cinetina (Varner et al., 1963; Sprent, 1968a, b; Locker e Ilan, 1975), além de que o tratamento de cinetina pode reverter o efeito inibidor do ácido abacísico sobre a atividade de amilase (Yomo e Varner, 1973). Short e Torrey (1972) encontraram durante a fa-

se de mobilização das reservas, altos níveis de zeatina em pontas de raízes de ervilha, local este estabelecido como sítio de síntese de citocininas na planta (Kende, 1965; Itai e Vaadia, 1965; Carr e Burrows, 1966 e Burrows e Carr, 1969). Neste presente trabalho, o nível endógeno de citocininas aumentou até 15 horas (fig. 45) demonstrando que este grupo de hormônios estava presente durante as etapas iniciais de germinação. A análise de outras espécies de plantas mostrou que cinetina também aumentou a hidrólise do amido em cotilédones destacados de girassol (Gilad, Ilan e Reinhold, 1970) e em abóbora, benziladenina foi capaz de substituir a presença do embrião na promoção da atividade de outras enzimas como isocitrato liase, proteases e dipeptidases (Penner e Ashton, 1967a,b; Sze e Ashton, 1971).

A influência de citocininas na atividade de enzimas envolvidas na degradação de reservas parece ser um fenômeno comum em dicotiledôneas, o que representa o envolvimento de um grupo hormonal diferente daquele visto em monocotiledôneas, em especial para cereais, no controle da mobilização de reservas.

A análise mais detalhada sobre a influência de benziladenina, em várias concentrações, na atividade amilolítica de cotilédones de-embrioados ou presos ao embrião (fig. 32a), mostrou que a presença do embrião impediu o aumento da atividade amilolítica, enquanto que em cotilédones de-embrioados esta atividade foi correlacionada com o aumento das concentrações de benziladenina. A concentração de 10^{-6} M substituiu completamente o efeito do eixo, concentrações abaixo desta tiveram efeito menor que o do eixo e concentrações acima desta suplantaram a promoção de atividade dada pelo eixo. Estes dados concordam com os de Gepstain e Ilan (1970) para ervilha, onde em cotilédones na presença de embrião não houve aumento da atividade amilolítica com o aumento de concentrações de cinetina, enquanto que em cotilédones de-embrioados houve forte correlação entre estes dois fatores. Neste caso, entretanto, as concentrações de cinetina aplicadas não foram capazes de suplantarem o efeito dado pelo embrião. Parece, então, que benziladenina talvez seja mais efetiva na promoção da atividade amilolítica que a cinetina, já que as concentrações destas duas substâncias foram similares nos dois experimentos. O fato de não haver aumento na atividade amilolítica com o aumento da concentração de benziladenina, em

cotilédones na presença do embrião, sugere uma influência do eixo embrionário no grau da atividade amilolítica a qual poderia ser dada através de dois caminhos: ou através de um inibidor que controlaria a taxa de atividade das amilases, ou então através de competição entre as citocininas naturais, liberadas pelo eixo, e a benziladenina pelos receptores destas substâncias, que no caso deveriam favorecer as citocininas naturais. Corroborando esta hipótese, Locker e Ilan (1975) notaram que, em ervilha, as citocininas naturais, zeatina e seu ribosídeo, foram mais efetivas na promoção de atividade de amilases em cotilédones destacados que cinetina ou benziladenina. Isto indicaria que as citocininas sintéticas talvez precisassem ser modificadas estruturalmente antes de atuarem na atividade enzimática, como acontece com o esteviol, uma substância de estrutura semelhante e das giberelinas, que só passa a ter atividade giberelínica depois de ser convertido em giberelinas dentro do tecido vegetal (Ruddat, Heftmann e Lang, 1965).

A hipótese de que a menor atividade em cotilédones presos ao embrião, sob tratamento de benziladenina, tinha sido causada por um inibidor foi testada através da mistura de extratos de cotilédones tratados com benziladenina, de-embrioados ou presos ao embrião (fig. 34 e tab. 12 e 13). Encontrou-se evidências da presença de inibidores, uma vez que extratos de cotilédones com embrião conseguiram diminuir a atividade de extratos de cotilédones de-embrioados. Este inibidor liberado para o cotilédone nas primeiras etapas de germinação, talvez controlaria o fornecimento de produtos degradados para o embrião em crescimento.

O embrião, além de promover a atividade hidrolítica, através da liberação de citocininas, poderia também controlar esta atividade em termos de maior ou menor demanda de nutrientes dos cotilédones para o tecido embrionário em crescimento. Desta forma, baixas taxas de incorporação de produtos de hidrólise levaria a um acúmulo destes produtos nas vias de translocação, inibindo subsequente degradação das reservas. Oaks (1965) mostrou que, em milho, um fornecimento de aminoácidos exógenos ao meio de cultura do grão em germinação teve o efeito de inibir a degradação de reservas proteolíticas. Estes dados também foram observados em ervilha por Yomo e Varner (1973).

Em plantas epígeas foi sugerido que a luz poderia influir no controle da atividade hidrolítica, tanto assim que Van Onckelen et al. (1977) mostraram que cotilédones de feijão colocados no escuro tinham um aumento na atividade de amilase em relação àqueles colocados na luz, havendo uma forte correlação entre o aumento no conteúdo em clorofila e a inibição da atividade amilolítica.

Neste presente trabalho procurou-se estudar estas interações, tanto em relação à luz como em relação ao tratamento de benziladenina, uma vez que, como visto anteriormente, este tratamento aumentou o conteúdo de clorofila no tecido (tab. 9).

Foi observado que o conteúdo de clorofila foi maior em cotilédones destacados, tanto no controle, como nos tratados com benziladenina, indicando a influência do embrião no controle dos níveis de clorofila dos cotilédones. Também foi observado que em presença de luz o tratamento de benziladenina, embora tenha aumentado o conteúdo de clorofila total, não modificou a proporção entre clorofila a e b, sendo, como nos controles, a quantidade de clorofila a mais abundante, concordando, neste aspecto, com os dados de Van Onckelen et al. (1977). Entretanto, com relação à atividade amilolítica estes dados não coincidem com os dados dos autores acima citados, não se encontrando diferenças entre a atividade amilolítica de cotilédones colocados na luz ou no escuro, com exceção de cotilédones destacados tratados com benziladenina, onde a atividade foi maior na luz que no escuro, sendo o oposto do encontrado no trabalho de Van Onckelen et al. (1977). Estes autores, entretanto, não examinaram as interações entre luz, benziladenina e atividade amilolítica, não podendo os dados deste presente trabalho serem comparados.

O desenvolvimento da atividade amilolítica não foi detectado antes de 44 horas de embebição da semente, mas aumentou rapidamente após o terceiro dia (figs. 36a e 38a), fase em que a matéria seca da reserva estava sendo rapidamente translocada (figs. 35a e 37b), caindo somente após o 9º dia, quando as reservas já começavam a se esgotar. Assim o aumento na atividade amilolítica foi altamente correlacionado com o aumento do crescimento do eixo e diminuição do peso seco dos cotilédones, sugerindo que este material estava sendo degradado e transferido pa

ra o eixo em crescimento. A análise da atividade de β amilases (fig. 38b) mostrou que em relação ao total a atividade foi pequena e permaneceu constante durante todo o experimento, sendo, desta forma, a amilase a enzima responsável pela maior parte da degradação do amido. No 3º dia de germinação a atividade de β amilases foi maior que a de α amilases, entretanto após este dia houve rápido aumento na atividade de α amilases. Estes dados são similares àqueles vistos em milho por Dure (1960), onde β amilase representava apenas uma pequena fração do total das enzimas amilolíticas, não aumentando em atividade durante o desenvolvimento. Baixa atividade de β amilase durante o desenvolvimento também foi observada em arroz, aveia e sorgo (French, 1960). Entretanto estes dados não concordam com os de Van Onckelen et al. (1977), onde foi verificado que a atividade de β amilases aumentou durante os seis primeiros dias de germinação de feijão. Juliano e Varner (1969) entretanto, trabalhando com ervilhas, mostraram que β amilase sempre esteve presente num nível baixo e constante durante os 15 primeiros dias de germinação, sendo que a α amilase foi sintetizada nos primeiros dias de germinação e as taxas mais rápidas de degradação de matéria seca coincidiram com o aparecimento desta enzima. Estes dados coincidem com os resultados obtidos neste presente trabalho. Por estes motivos, Juliano e Varner (1969) concluíram que as enzimas mais importantes para a degradação do amido eram as α amilases, enquanto que β amilases só atacariam oligossacarídeos produzidos pela ação de α amilases. Os estudos de Walker e Hope (1963) corroboram estes dados, uma vez que estes autores mostraram que somente a α amilase poderia hidrolisar grãos de amido.

A atividade proteolítica foi relativamente alta (fig 36b) no 3º dia de germinação, mostrando atividade máxima no 5º dia de crescimento, como encontrado por Yomo e Srinivasan (1973) também em Phaseolus. A aplicação de benziladenina levou a um pequeno aumento na atividade proteolítica, sem modificar o padrão desta atividade. O fato de que a atividade proteolítica foi alta no início da germinação e teve um pico de máxima atividade anterior ao de amilases, corrobora os dados vistos para a análise de crescimento, onde as reservas protéicas foram utilizadas relativamente mais rápido que matéria seca. Esta utilização mais rápida das reservas protéicas também foi demonstrada

em cevada (Folkes, Willis e Yemm, 1952; Métivier e Dale, 1977a) e em milho (Monteiro, 1979), sendo que talvez isto seja reflexo da existência de algumas proteases já na semente seca (Yomo e Srinivasan, 1973; Chrispeels, Baumgartner e Harris, 1976; Bewley e Black, 1978).

Interessante notar que a atividade hidrolítica só começou a diminuir quando as reservas estavam esgotadas, sugerindo que as enzimas uma vez sintetizadas permanecem ativas, só sendo degradadas quando as reservas são esgotadas. Assim, em ensaios "in vitro" é comum encontrar máximos de atividade após o período máximo de utilização das reservas, como foi observado por Beevers (1968) para a atividade proteolítica em cotilédones de ervilha, onde a maior degradação de proteínas ocorreu entre os dias 2 e 8, enquanto que o pico máximo de atividade proteolítica "in vitro" foi ao redor do dia 11. Isto poderia ser interpretado de várias maneiras: em primeiro lugar existem várias proteases, peptidases e isoenzimas e amilases (Beevers, 1968; Mikola e Kolehmainen, 1972; Bilderback, 1974; Ellerman, 1974; Ashton, 1976). Assim, em qualquer dosagem utilizando um único substrato, a atividade encontrada não seria um reflexo da atividade "in vivo". Uma outra explicação seriam as evidências de que são sintetizadas mais enzimas hidrolíticas que necessárias, havendo "in vivo" competição pelo substrato, uma vez que normalmente a degradação das reservas se faz através de uma frente de hidrólise (Briggs, 1972). Assim, quando estas enzimas são extraídas e colocadas num substrato não limitante, em condições ótimas de pH e temperatura, sua atividade parecerá muito mais alta "in vitro" que "in vivo". Em aveia (Sutcliffe e Baset, 1973) e feijão (Bewley e Black, 1978) sabe-se que a degradação das reservas tem início numa determinada região, e então vão se alastrando para outras porções dos cotilédones. No primeiro caso a hidrólise começa no escutelo e daí prossegue para o endosperma e em Phaseolus vulgaris o início da hidrólise começa na região central do cotilédone e se espalha para o exterior, evitando as zonas logo ao redor dos eixos vasculares. Uma outra possibilidade é de que inibidores presentes "in vivo" (Burger e Siegelman, 1966), talvez se tornem menos efetivos "in vitro". Também "in vivo" as taxas de hidrólise poderiam ser artificialmente baixas se no tecido comessem a acumular produtos

de hidrólise; entretanto no tempo zero de reação "in vitro" a concentração do substrato é 100% e a do produto zero, havendo por isto um aumento de atividade.

Desta forma, estes vários pontos levantam uma questão extremamente importante neste tipo de estudo, onde em muitos casos não há correlação entre a atividade enzimática e a degradação de reservas sendo que altas e baixas atividades enzimáticas não são necessariamente acompanhadas por altas e baixas taxas de hidrólise (Bewley e Black, 1978). Este fato também foi estudado por Beevers (1968) que analisou os dados de vários outros autores com relação a este problema, chegando também a conclusão de que nem sempre há correlação entre atividade enzimática "in vitro" e a hidrólise de reservas "in vivo".

Este aspecto pode ser observado neste presente trabalho (figs. 35, 36, 37 e 38) onde embora tenha sido visto que o aumento de atividade de amilases e proteases coincidiu com o crescimento do eixo e perda de peso dos cotilédones, uma análise mais detalhada mostrou que esta relação não foi, na verdade, tão simples. Tanto no caso de amilases (fig. 35c) como no caso de proteases (fig. 37c) foi visto que o ganho de peso pelo eixo em brionário em plantas controle foi maior que aquele visto em plantas tratadas com benziladenina, e que isto foi refletido na correspondente perda de peso pelos cotilédones, estabelecendo uma forte relação entre utilização das reservas e o crescimento do eixo. A análise da atividade enzimática revelou, entretanto, que plantas tratadas com benziladenina mostraram maior atividade amilolítica (figs. 36 e 38), apesar do cotilédone ter apresentado uma perda de peso mais lenta e um correspondente menor crescimento do embrião. Desta forma, estes dados corroboram a proposição de Bewley e Black (1978) de que a atividade enzimática não é necessariamente um reflexo da mobilização de reservas.

Finalmente deve ser considerado o efeito distinto do tratamento de benziladenina sobre processos como a atividade enzimática e o crescimento e metabolismo geral da planta. Desta forma, concentrações de benziladenina que promovem a atividade amilolítica e proteolítica poderiam também ter um efeito simultâneo, através de outros caminhos, sobre o crescimento geral da planta. Foi visto nos experimentos de análise de crescimento que um dos efeitos mais nítidos de benziladenina sobre a morfo-

logia externa da planta foi a redução da área foliar, mesmo na concentração de 10^{-6} M que, em relação à atividade amilolítica, não modificou a atividade enzimática normalmente encontrada em cotilédones de plantas controle. Entretanto, como foi verificado por Dale (1972), o principal órgão responsável pelo suprimento de carbono à planta em desenvolvimento são as folhas. Assim, a redução na área foliar, provocada pelo tratamento de benziladenina, levaria a uma diminuição na taxa de crescimento da planta, pela redução de fotossíntese. Esta diminuição na fixação de carbono poderia levar a uma maior utilização das reservas em amido. Isto não foi observado, indicando que a não utilização das reservas em cotilédones de plantas tratadas foi devido a menor demanda de nutrientes, mesmo sendo a fixação de carbono reduzida. Esta hipótese de menor demanda de nutrientes pelo eixo foi corroborada pelo fato de que as proteínas também não foram utilizadas em plantas tratadas. Assim, mesmo em plantas intactas o tratamento de benziladenina poderia provocar maior síntese de enzimas, mas a atividade destas seria reduzida pelo acúmulo de produtos "in vivo".

Em resumo, os estudos feitos neste trabalho sobre o crescimento inicial da planta e a utilização das reservas cotiledonares mostraram que embora o ácido giberélico tenha efeito sobre a morfologia externa da planta e giberelinas estejam presentes em altos níveis no início da germinação, este grupo de hormônios não parecem ter efeito direto sobre a atividade de amilases e proteases. Entretanto a presença deste hormônio sugere que eles estejam envolvidos em outros processos paralelos ocorridos durante a germinação. Entretanto, as citocininas, também presentes em altos níveis durante o início da germinação, promovem a atividade hidrolítica, sugerindo que "in vivo" este grupo de hormônios esteja implicado na degradação das reservas de amido e proteína.

RESUMO

Este trabalho apresenta dados sobre as mudanças nos níveis hormonais endógenos de giberelinas e citocininas; a utilização das reservas da semente e o crescimento inicial de Phaseolus vulgaris cv carioca, como também sobre o efeito da aplicação de ácido giberélico (GA_3) e 6-benziladenina (6-BA) sobre a atividade de amilases e proteases.

A absorção de água pela semente mostrou duas fases distintas, e as taxas respiratórias aumentaram rapidamente até 20 horas de embebição, período no qual o embrião contribuiu com 45% da absorção total de oxigênio pela semente.

O peso seco do embrião aumentou continuamente após 20 horas de embebição, crescendo rapidamente às expensas das reservas cotiledonares, as quais foram esgotadas no oitavo dia de crescimento. As proteínas de reserva foram utilizadas relativamente mais rápido que a de matéria seca, e maior quantidade foi translocada para a parte aérea, cujo peso seco também foi maior que aquele da raiz, devido principalmente ao primeiro par de folhas.

GA_3 não afetou a distribuição de matéria seca ou de proteínas, mas reduziu significativamente a área da folha, enquanto, simultaneamente, promoveu alongamento do hipocótilo e epicótilo. 6-BA reduziu a altura total da planta a área foliar e o peso seco de raiz e parte aérea, reduzindo também a utilização de matéria seca e protéica cotiledonar pela planta. O diâmetro do caule foi aumentado, tanto como os níveis de clorofila nas folhas e cotilédones.

A atividade de amilases foi baixa na semente seca, aumentando rapidamente do 3º ao 8º dia, atingindo aí um máximo de atividade, permanecendo, entretanto, com altos níveis até que as reservas cotiledonares fossem esgotadas. Esta atividade foi atribuída principalmente à α amilase. A atividade proteolítica total, com pH ótimo entre 5-6, teve um pico de atividade anterior que o de atividade amilolítica, no 6º dia, mantendo este

nível constante, sendo a liberação de aminoácidos maior em pH entre 5-6. Cotilédones destacados mostraram baixos níveis de atividade indicando que a presença do embrião não é absolutamente necessária para o início da hidrólise.

GA₃ não afetou tanto a atividade amilolítica como a proteolítica, enquanto 6-BA aumentou significativamente ambas, e pôde substituir o efeito do eixo em cotilédones destacados. Este efeito foi dependente da concentração, sendo a atividade amilolítica dada pelo embrião completamente substituída pela concentração de 10⁻⁶M de 6-BA, abaixo desta a atividade foi reduzida e acima desta a atividade aumentou em cotilédones destacados, mas foi mantida a níveis constantes na presença do embrião, sugerindo um controle, provavelmente através de um inibidor.

Os níveis endógenos de giberelinas e citocininas aumentaram durante os primeiros estágios de germinação, caindo para níveis iniciais após 24 horas. A análise dos valores de Rf indicam a presença de mais de uma forma do hormônio em ambos os casos.

Os resultados, no total, sugerem que os níveis endógenos destes hormônios poderiam estar correlacionados com a iniciação do crescimento do eixo, e que citocininas, mas não giberelinas, estariam envolvidas no controle da degradação das reservas. A interpretação da atividade enzimática "in vitro", particularmente em cotilédones destacados, deve ser feita com cuidado, uma vez que a fisiologia da planta intacta poderia ser afetada pela aplicação exógena de reguladores de crescimento em baixas concentrações.

SUMMARY

This work reports data upon changes in the endogenous levels of gibberellins and cytokinins, the utilization of seed reserves and early growth of Phaseolus vulgaris cv carioca, as well as the effect of applied gibberellic acid (GA_3) and 6-benziladenine (6-BA) upon the activity of amylases and proteases in the cotyledon.

Water uptake showed two distinct phases and respiration rates increased rapidly up to 20 hours at which time the embryo accounted for 45% of the total oxygen absorbed by the seed.

Embryo dry weight increased continually from 20 hours, growing rapidly at the expense of cotyledonary reserves, which became exhausted on day 8. Protein reserves were utilized relatively faster than dry matter and greater amounts were translocated to the shoot whose dry weight was also than that of the root, principally due to the first leaf pair.

GA_3 did not affect the distribution of dry matter nor protein but significantly reduced leaf area while simultaneously promoting etiolation of the hypocotyl and epicotyl. 6-BA reduced total plant height, leaf area, root and shoot dry weight and reduced the utilization of cotyledonary dry matter and protein reserves in whole plants. Stem girth was increased as were levels of chlorophyll in leaves and cotyledons.

Amylase activity was low in the dry seed increasing rapidly from day 3 to a peak on days 8-9 thereafter remaining at a high level until the hydrolysis of the cotyledonary reserve was complete. Total activity was attributable principally to α amylase. Total proteolytic activity, with a pH optimum between 5-6, peaked earlier on day 6 thereafter maintaining constant levels, aminoacid liberation being maximal at an pH between 5-6. Detached cotyledons showed low levels of activity indicating that the presence of the embryo is not absolutely necessary for the initiation of hydrolysis.

GA₃ had no effect upon amylolytic or proteolytic activity whereas 6-BA significantly increased both and could substitute the axis in detached cotyledons. This effect was concentration dependent, full amylolytic activity being replaced by 10⁻⁶M 6-BA; below this full activity was reduced though above this activity increases in detached cotyledons but was maintained at constant levels in the presence of the embryo suggesting some means of control, probably through an inhibitor.

Endogenous levels of gibberellins and cytokinins initially increased during the early stages of germination, falling to initial levels after approximately 24 hours. Analysis of Rf values indicated the presence of more than one form of the hormone in both cases.

The results in total suggest that endogenous hormone levels may be correlated with the initiation of embryo growth and that cytokinins, but not gibberellins, are involved in the degradation of reserve degradation. Interpretation of "in vitro" enzyme activity, particularly in detached cotyledons, approached with caution as whole plant physiology may also be affected with the application of exogenous regulators at low concentrations.

BIBLIOGRAFIA

- ARNON, D.I., 1949. Cooper enzyme in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24:1-15.
- ASHTON, F.M., 1976. Mobilization of seed storage proteins. Ann. Rev. Plant Physiol. 27:95-117.
- ASHTON, F.M. e DAHMEN, J., 1967a. Purification and characterization of a dipeptidase from Cucurbita maxima cotyledons. Phytochemistry 6:1215-1225.
- ASHTON, F.M. e DAHMEN, J., 1967b. A partial purification and characterization of two peptidases from Cucurbita maxima cotyledons. Phytochemistry 6:641-653.
- BAGLEY, B.W.; CHERRY, J.H.; ROLLINS, M.L. e ALTSCHUL, A.M. 1963. A study of protein bodies during germination of peanut (Arachis hypogaea) seed. Ann. J. Bot. 50:523-532.
- BAILEY, C.J. e BOULTER, D. 1970. The structure of legumin, a storage protein of broad bean (Vicia faba) seed. Eur. J. Biochem. 17:460-466.
- BAIN, J. e MERCER, F.V., 1966. Subcellular organization of developing cotyledons of Pisum sativum. J. Biol. Sci. 19:49-67.
- BARKER, R.D.G.; DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, A. e BOULTER, D. 1976. Purification and characterization of the major storage proteins of Phaseolus vulgaris seeds and their intracellular cotyledonary distribution. Phytochemistry 15:751-757.
- BASHA, S.M.M. e BEEVERS, L. 1975. The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of Pisum sativum L. Planta 124:77-87.

- BEEVERS, L. 1968. Protein degradation and proteolytic activity in the cotyledons of germinating pea seeds (Pisum sativum). *Phytochemistry* 7:1837-1844.
- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen metabolism in Plants. Arnold. London.
- BEEVERS, L. e GUERNSEY, F.S. 1966. Changes in some nitrogenous components during the germination of pea seeds. *Plant Physiol.* 41:1455-1458.
- BEEVERS, L. e SPLITTSTOESSER, E. 1968. Protein and nuclei acid metabolism in germinating peas. *J. Exp. Bot.* 19:61, 698-711.
- BERNFELD, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in Enzimology* 12:379-428.
- BERNFELD, P. 1955. Amylases. In *Methods in Enzymology*. Ed. by S.P. Colowick and N.P. Kaplan. Academic Press Inc. N.Y.
- BEWLEY, J.D. e BALCK, M. 1978. Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 1. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. New York.
- BILDERBACK, D.E. 1974. Amylases from aleurone layers and starch endosperm of barley seeds. *Plant Physiol.* 53:480-484.
- BIELSKI, R.L. e TURNER, N.A. 1966. Separation and estimation of amino acid in crude plant extracts by thin layer eletrophoreses and chromatography. *Analyt. Biocem.* 17:278-282.

- BLENKINSOP, P.G. e DALE, J.E. 1974. The effects of shade treatment and light on ribulose 1-5 diphosphate carboxylase-activity and Fraction I protein level in the first leaf of barley. *J. Exp. Bot.* 25:899-912.
- BRIAN, P.W. 1966. The gibberellins as hormones. *Int. Rev. Citol.* 19:229-265.
- BRIAN, P.W. e HEMMING, H.G. 1957. Effect of gibberellic acid and kinetin on growth of pea stem sections. *Naturwiss* 44:594.
- BRIATY, L.G.; COULT, D.A. e BOULTER, D. 1969. Protein bodies of developing seeds of *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* 20:358-362.
- BRIGGS, D.E. 1968. Amylase in germinating, decorticated barley I. *Phytochemistry* 7:513-529.
- BRIGGS, D.E. 1972. Enzyme formation, cellular breakdown and the distribution of gibberellins in the endosperm of barley. *Planta* 108:351-358.
- BROWN, R. 1943. Studies in germination and seedling growth. *Ann. Bot.* 7:93-112.
- BROWN, R. 1972. Germination. In *Plant Physiology* VIC: Ed.F.C. Steward. Academic Press. London.
- BURGER, W.C. e SIEGELMAN, H.W. 1966. Location of a protease and its inhibitor in the barley kernel. *Physiol. Plant.* 19:1089-1093.
- BURROWS, W.G. e CARR, D.J. 1969. Effects of flooding the root system of sunflower plants on the cytokinin content in the xylem sap. *Physiol. Plant.* 22:1105-1112.
- CARR, D.J. e BURROWS, N.G. 1966. Evidence of the presence in xylem sap of substances with kinetin-like activity. *Life Sci.* 5:2061-2077.

- CATSIMPOOLAS, S.N.; CAMPBELL, T.G. e MAYER, E.W. 1968 Immuno-chemical study of changes in reserve proteins of germinating soybean seeds. *Plant Physiol.* 43:799-805.
- CHERRY, J.H. 1973. *Molecular Biology of Plants*. Columbia University Press.
- CHIM, T.Y.; POULSON, R. e BEEVERS, L. 1972. The influence of axis removal on protein metabolism in cotyledons of Pisum sativum L. *Plant Physiol.* 49:482-489.
- CHING, T.M. 1972. Metabolism of germinating seeds. In *seed Biology*. Vol. II. Acad. Press. London.
- CHRISPEELS, M.J.; BAUMGARTNER, B. e HARRIS, N. 1976. Regulation of reserve protein metabolism in the cotyledons of mung bean seedlings. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73:3168-3172.
- CHRISPEELS, M.J. e VARNER, J.E. 1966. Inhibition of gibberellic acid and induced formation of amilase by abscisin II. *Nature* 211:1066-1067.
- DALE, J.E. 1964. Leaf growth in Phaseolus vulgaris I. Growth of the first pair of leaves under constant conditions. *Ann. Bot.* 28:579-589.
- DALE, J.E. 1969. Gibberellins and the early growth in seedlings of Phaseolus vulgaris. *Planta* 89:155-164.
- DALE, J.E. 1972. Growth and photosynthesis in the first leaf of barley. The effect of time of application of nitrogen. *Ann. Bot.* 36:967-979.
- DALE, J.E. e FELIPPE, G.M. 1972. Effects of shading in the first leaf on the growth of barley plants. II. Effects on photosynthesis *Ann. Bot.* 36:397-409.

- DAUSSANT, J.; NEUCERE, N.J. e CONKERTON, E.J. 1969 Immunochemical studies on Arachis hipogaea proteins with particular reference to the reserve proteins II. Protein modification during germination. *Plant. Physiol.* 44:480-489.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. e BOULTER, D. 1976. Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15: 3-24.
- DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, D.J.N.; NEAT, E. e BOULTER, D. 1976. Seed proteins of Phaseolus and Vigna. *New Phytol.* 76:283-288.
- DURE, L. 1960. Gross nutritional contributions of maizes endosperm and scutellum to germination growth maizes axis. *Plant Physiol.* 35:919-925.
- DURLEY, R.C.; McMILLAN, J. e PRICE, R.J. 1971. Investigation of gibberellins and other growth substances in the seed of Phaseolus multiflorus and of Phaseolus vulgaris by gaz chromatography and by chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry* 10:1891-1908.
- DURLEY, R.C.; SASSA, T. e PHARIS, R.P. 1979. Metabolism of tritiated gibberellin A₂₀ in immature seeds of dwarf pea cv Meteor. *Plant Physiol.* 64:214-219.
- EARLE, F.R. e JONES, Q. 1962. Analyses of seed samples from 113 plant families. *Econ. Bot.* 16:221-250.
- EASTWOOD, D.; TAVERER, R.J.A. e LAIDMAN, D.L. 1969. Sequential action of cytokinin and gibberellic acid in wheat aleurone tissue. *Nature* 221:1267.
- ELLERMAN, T.C. 1974. Aminopeptidases of pea. *Biochem. J.* 141: 113-118.
- FELIPPE, G.M. e DALE, J.E. 1972. The uptake of ¹⁴CO₂ by developing first leaves of barley and the partition of labelled assimilates. *Ann. Bot.* 36:411-418.

- FELIPPE, G.M. e DALE, J.E. 1973. Effects of shading the first leaf of barley plants on growth and carbon nutrition of the stem apex. *Ann. Bot.* 37:63-76.
- FELIPPE, G.M.; BOSCHINI, J.; AMABIS, J.M. e ROSSI, C.L. 1971. Effect of different levels of gibberellic acid on plants with know quantity of CCC. *Hoehnea* 1:115-118.
- FILNER, P. e WARNER, J.E. 1967. A test for de novo synthesis of enzymes; density labelling with H_2O^{18} of barley amylase induced by gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58:1520-1526.
- FISHER, E.H. e STAIN, E.A. 1960. α amylases. In *The Enzymes*. Vol. IV 313-343 Ed. Paul D. Boyler. Academic Press. New York.
- FOLKES, B.F. e YEMM, E.W. 1958. The respiration of barley plants X. Respiration and metabolism of aminoacids and protein in germinating grain. *New Phytol.* 57:106-131.
- FOLKES, B.F.; WILLIS, A.F. e YEMM, E.W. 1951. The respiration of barley plants VII. The metabolism of nitrogen and respiration in seedlings. *The New Phytologist* 51:317-341.
- FRANKLAND, B. e WAREING, P.F. 1960. Physiological effect of gib. acid on hypocotyl growth of lettuce seedling. *Nature* 185:255-256.
- FRENCH, D. 1960 β amylases. In *The Enzymes*. Vol. IV: 345-368 Ed. Paul D. Boyler. Academic Press. New York.
- GEPSTAIN, S. e ILAN, I. 1970. A promotive action of kinetin on amylase activity in cotyledons of Phaseolus vulgaris. *Plant and Cell Physiol.* 11:819-822.

- GILAD, T.; ILAN, I. e REINHOLD, L. 1970. The effect on kinetin and the embryo axis on the level of reducing sugars in sunflower cotyledons. *Israel. J. Bot.* 19:447-450.
- GOLDSTEIN, L.D. e JENNINGS, P.H. 1975. The occurrence and development of amylase enzymes in incubated, de-embryonated maize kernels. *Plant Physiol.* 55:893-898.
- GOTOH, N. e ESASHI, Y. 1973. Diffusible and extractable gibberellins in bean cotyledons in relation to dwarfisms. *Physiol. Plant.* 28:480-489.
- GREENWOOD, C.T. e THONSON, J. 1962. Studies on the biosynthesis of the components of starches from smooth and wrinkled peas during growth. *Biochem. J.* 82:156-164.
- GUARDIOLA, J.L. e SUTCLIFFE, J.F. 1971. Control of protein hydrolysis in the cotyledons of germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *Ann. Bot.* 35:791-807.
- GUPTA, G.R.P. e MAHESHWARI, S.C. 1970. Cytokinins in seeds of pumpkin. *Plant Physiol.* 45:14-18.
- HARVEY, B.M.R. e OAKS, A. 1974. The role of gibberellic acid in the hydrolysis of endosperm reserves in *Zea mays*. *Planta* 121:67-74.
- HOCK, I. 1969. Inhibition of isocitrate lyase in watermelon seedlings by white light. *Planta* 85:340-350.
- HOPKINSONS, J.M. 1964. Studies on the expansion of the leaf surface IV. The carbon and phosphorus economy of a leaf. *J. Exp. Bot.* 15:125-137.
- HUANG, R.C. e BEEVERS, L. 1974. Developmental changes in Endosperm of germinating castor bean independent of embryonic axis. *Plant. Physiol.* 54:277-279.
- HUTCHINSON, J. 1964. The genera of flowering plants. Vol. I. Clarendon Press. Oxford.

- INGLE, J.; BEEVERS, L. e HAELGMAN, R.H. 1964. Metabolic changes associated with the germination of corn I. Changes in weight metabolites and their distribution in the embryo axis, scutellum and endosperm. *Plant Physiol.* 39:735-740.
- ITAI, C. e VAADIA, Y. 1965. Kinetin-like activity in root exudate of water stressed sunflower plants. *Physiol. Plant.* 18:941-944.
- JONES, F. 1964. Examination of the gibberellins of Zea mays and Phaseolus multiflorus using thin-layer chromatography. *Nature* 202:1309-1310.
- JONES, R.L. e STODDART, J.L. 1977. Gibberellins and seed germination in *The Physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination*. Ed. A.A. Khan. North-Holland. Amsterdam.
- JULIANO, B.O. e VARNER, J.E. 1969. Enzymic degradation of starch granules in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiol.* 44:886-892.
- KATSUMI, M. 1962. Physiological effects of kinetin. Effect on the thickening of etiolated pea stem section. *Physiol. Plant.* 15:115-121.
- KAWASHIMA, N. e WILDMAN, S.G. 1970. Fraction I protein. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 21:325-358.
- KENDE, H. 1965. Kinetin-like factors in the root exudate of sunflowers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53: 1302-1307.
- KHRISHNAMOORTHY, H.N. 1975. *Gibberellins and Plant Growth*. Ed. H.N. Khrishnamoorthy. Wiley Eastern Limited. New Delhy.
- KOSHIMIZU, K.; KUSAKI, T.; MITSUI, T. e MATSUBARA, S. 1967. Isolation of a cytokinin, (-) - Dihidrozeatin, from immature seeds of Lupinus luteus. *Tetrahedron Let.* 14:1317-1320.

- KOZLOWSKI, T.T. 1972. Seed Biology. Vol II. Academic Press. London.
- LADO, P.; SCHWENDIMAN, M. e MARRÉ, E. 1968. Repression of isocitrate lyase synthesis in germinated in the presence of glucose. *Biochim. Biophys. Acta* 157:140-148.
- LARSON, L.A. e BEEVERS, H. 1965. Amino acid metabolism in young pea seedlings. *Plant Physiol.* 40:424-432.
- LEINER, I.E. 1976. Phytohemagglutinins (Phytolectins). *Ann. Rev.* 27:291-319.
- LETHAM, D.D. 1968. A new cytokinin bioassay and the naturally occurring cytokinins complex, pp. 19-32. In F. Wightman and G. Setterfield. (eds.) Runge Press. Ottawa.
- LIDDLE, A.M.; MANNERS, D.J. e WRIHT, A. 1961. Studies on carbohydrate metabolizing enzymes⁶. The activity of potato phosphorylase on starch type polysaccharides. *Biochem. J.* 80:301-309.
- LOCKER, A. e ILAN, I. 1975. On the nature of the hormonal regulation of amylase activity in cotyledons of germinating peas. *Plant. and Cell Physiol.* 16:449-454.
- LOPES, A. e GRABE, D.F. 1971. Effect of seed protein content on plant growth of barley and wheat. *Agron. Austr.* pg. 44.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. e RANDAL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- MACLEOD, A.M. e MILLAR, A.H. 1962. Effect of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brewing* 68:322-332.
- MACLEOD, A.M. e PALMER, G.H. 1967. Gibberelling from barley embryos. *Nature* 216:1342-1343.

- MARCUS, A. e FEELY, J. 1964. Isocitric lyase formation in the dissected peanut cotyledon. *Biochim. Biophys. Acta* 89:170-171.
- MARRIOT, K.M. e NORTHCOTE, D.H. 1975. The breakdown of lipide reserves in the endosperm of germinating castor bean. *Biochem. J.* 148:139-144.
- MAYER, A.M. e POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975. The germination of seeds. Pergamon. Press.
- McCOMB, A.J. 1961. "Bound" gibberellin in nature runner bean seeds. *Nature*:192:575-576.
- McLEESTER, R.C.; HALL, T.C.; SUN, S.M. e BLISS, F.A. 1973. Comparasion of globulin proteins from Phaseolus vulgaris with those from Vicia faba. *Phytochemistry* 2:85-93.
- MÉTIVIER, J.R. 1975. Studies on the growth and photosynthesis of barley as affected by grain nitrogen and exogenously supplied nitrate. PhD Thesis. Universidade de Edimburgo, Inglaterra.
- MÉTIVIER, J.R. 1979. The effect of time of nitrate application upon the growth of barley cultivars of differing endogenous nitrogen levels: Long term experiments. *Ann. Bot.* 43: 753-764.
- MÉTIVIER, J.R. e DALE, J.E. 1977a. The utilization of endosperm reserves during early growth of barley cultivars and effect of time of application of nitrogen. *Ann. Bot.* 41:15-728.
- MÉTIVIER, J.R. E DALE, J.E. 1977b. The effects of grain nitrogen and applied nitrate on growth photosynthesis and protein content of barley cultivars. *Ann. Bot.* 41:1287-1296.
- MIKOLA, J. e KOLEHMAIREN, L. 1972. Localisation and activity of various peptidases in germinating barley. *Planta* 104: 167-177.

- MILLERD, A. 1975. Biochemistry of legume seed proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26:53-72.
- MILLERD, A.; SIMON, M. e STERN, H. 1971. Legumin synthesis in developing cotyledons of Vicia faba. *Pl. Physiol.* 48:419 - 425.
- MONTEIRO, A.M. 1979. Utilização e translocação de reservas durante a germinação e desenvolvimento de plântulas de milho. Tese de mestrado (Inédito). UNICAMP.
- MUTO, S. e BEEVERS, H. 1974. Lypase activity in castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.* 54:23-28.
- NAYLOR, J.M. 1969. Regulation of enzyme synthesis in aleurone tissue of Avena species.. *Can. J. Bot.* 47:2069-2072.
- NYMAN, B. 1971. Light, seed coat and gibberellic acid in relation to the amylase activity in germinating Scots Pine seeds (Pinus silvestris). *Physiol. Plantarum* 25:112-117.
- OAKS, A. 1965. The regulation of nitrogen loss from maize endosperm. *Can. J. Bot.* 43:1077-1082.
- OPIK, H. 1972. Some observation of coleoptile cell ultrastructure in ungerminated grains of rice (Oryza sativa L.) *Planta* 102:61-72.
- OPIK, H. e SIMON, E.W. 1963. Water content and respiration rate bean cotyledons. *J. Exp. Bot.* 141:299-310.
- ORY, R.L. e HENNINGSEN, K.W. 1969. Enzymes associated with protein bodies isolated from ungerminated barley seeds. *Plant Physiol.* 44:1488-1498.
- OSBORNE, T.B. 1895. The chemical nature of diastase *J. Amer. Chem. Soc.* 17:587-603.

- OSBORNE, J.B. e CAMPBELL, G.F. 1896. The proteins of malt. J. Amer. Chem. Soc. 18:542-564.
- PALEG, L.G. 1960. Physiological effect of gib. acid: I on carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. Plant. Physiol. 35:293-299.
- PALMIANO, E.P. e JULIANO, B.O. 1972. Biochemical changes in the rice grain during germination. Plant Physiol. 49:751-756.
- PARKER, C.W. e LETHAM, D.S. 1973. Regulators of cell division in plant tissue XVI. Metabolism of zeatin by radish cotyledons and hypocotyls. Planta 114:199-218.
- PEGG, G.F. 1966. Changes in levels of naturally occurring gibberellin-like substances during germination of seed of Lycopersicum esculentum Mill. J. Exp. Bot. 17:214-230.
- PENNER, D. e ASHTON, F.M. 1967a. Hormonal control of isocitrate lyase synthesis. Biochem. Biophys. Acta 148:481-485.
- PENNER, D. e ASHTON, F.M. 1967b. Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. Plant Physiol 42:791-796.
- PEREIRA, M.F.A. 1978. Primordial development in Phaseolus. PhD Thesis. University of Edinburg.
- PIENFILD, N.J. 1968. The promotion of isocitrate lyase activity in hazel cotyledons by exogenous gibberellin. Planta 82:337-341.
- PRESLEY, H.J. e FOWDEN, L. 1965. Acid phosphatase and isocitritase production during seed germination. Phytochem. 4:169-175.
- PRISCO, J.T.; AINOUZ, I.L. e METO, S.C. 1975. Changes in Nitrogenous compounds and proteases during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant. 33:18-21.

- RADLEY, M. 1958. The distribution of substances similar to gibberellic acid in high plants. *Ann. Bot.* 22:297-307.
- RADLEY, M. 1967. Site of production of gibberellin-like substances in germinating barley embryos. *Planta* 75:164-171.
- RADLEY, M. 1969. The effect of the endosperm on the formation of gibberellin by barley embryos. *Planta* 86:218-223.
- REID, J.S.G. e MEIER, H. 1972. The function of the aleurone layer during galactomannan distribution in germinating seeds of fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.). Grinon clover (Trifolium encarnatum L.) and lucerne (Medicago sativa L.). A correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta* 106:44-60.
- RICHMOND, A.E. e LANG, A. 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached Xantium leaves. *Science* 125:650-651.
- ROPPE, de R.S. 1956. Kinetin and auxin activity. *Plant Physiol.* 31:253-254.
- ROSWELL, E.V. e GOAD, L.J. 1962. Latent amylase of wheat: its mode of attachment to glutenin and its release. *Biochem. J.* 84:73-74.
- RUDDAT, M.; HEFTMANN, E. e LANG A. 1965. Conversion of steviol to a gibberellin-like compound by Fusarium moniliforme. *Arch. Biochem. Biophys.* 111:187-190.
- RYAN, C.A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:173-196.
- SCALA, J.; PATRICK, C. e MACBETH, G. 1969. Gibberellic acid and castor bean fructose 1-6 diphosphatases. *Phytochem.* 8:37-44.

- SCHNARRENBERGER, C.; OESER, A. e TOLBERT, N.E. 1972 Isolation of protein bodies on sucrose gradients. *Plants* 104:185-194.
- SHINDY, W.W. e SMITH, D.E. 1976. Identification of plant hormones in cotton ovules. *Plant Physiol.* 55:550-554.
- SHORT, K.C. e TORREY, J. 1972. Cytokinins in seedling root of pea. *Plant Phisiol.* 49:155-160.
- SIMON, E.W. e MEANY, A. 1965. Utilization of reserves in germinating Phaseolus seed. *Plant. Physiol.* 40:1136-1139.
- SMITH, D.L. 1973. Nucleic Acid, protein and starch synthesis in developing cotyledons of Pisum arvense L. *Ann. Bot.* 37:795-804.
- SMITH, A.M. e AGIZA, A.H. 1951. The determination of amino acid colorimetrically by the ninhydrin reactios. *Analyst* 76:623-627.
- SOEDIGO, R. e GRUBER, M. 1960. Purification and some properties of a protease from pea seeds, Pisum sativum L. ssp. arvense. *Biophys. Acta* 44:315-323.
- SOKAL, R.R. e ROHLF, F. 1969. *Biometry* W.H. Lueman and Company.
- SPRENT, J.I. 1968a. Inability of gibberellic acid to stimulate amylase activity in pea cotyledons. *Planta* 82:299-301.
- SPRENT, J.I. 1968b. Effects of benzyladenina on cotyledon metabolism and growth peas. *Planta* 81:80-87.
- STAIN, D.L. e QUASTLER, H. 1963. The use of triated thymidine in the study of tissue activation during germinating in Zea mays. *Ann. J. Bot.* 50:1006-1011.
- STTODART, J.L.; BREIDENBACH, W.; NADEAU, R. e RAPPAPORT, L. 1974. Selective binding of ³H gibberellin A₁ by protein fractions from dwarf pea epicotyls. *Proc. Nat. Acad.* 71:3255-3259.

- SUGE, H. e GALLARDO, M.F. 1977. Changes of gibberellins during seed and pericarp development in common bean with special regard to abortion. *J. Crop. Sci.* 46:371-378.
- SUN, S.M. e HALL, T.C. 1975. Solubility characteristics of globulins from Phaseolus seeds in regard to their isolation and characterization. *Agric. Food. Chem.* 23(2):184-189.
- SUTCLIFFE, J.F. e BASET, G.A. 1973. Control of hydrolysis of reserve materials in the endosperm of germinating oat grain. *Plant Science Letters.* 1:15-20.
- SWAIN, R.R. e DEKKER, E.E. 1966. Seed germination studies I. Purification and properties of an amylase from the cotyledons of germinating pea seedlings. *Biochim. Biophys. Acta.* 122: 75-86.
- SZE, H. e ASHTON, F.M. 1971. Dipeptidase development in cotyledons of Cucurbita maxima during germination. *Phytochemistry* 10:2935-2942.
- UMBREIT, W.W. e BURRIS, R.H. 1964. Manometric techniques. Ed. Umbreit, W.W. Burris, R.H. e Stareffer, J.F. Minneapolis Burgess publishing Company.
- USBERTI, R. 1979. Estudo da germinação de sementes de limão-cravo (Citrus reticulata var. austera Hib. Swingle). Tese de mestrado. UNICAMP.
- VALIO, I.F.M. 1969. Promotion and inhibition of growth in Lunularia cruciata (L.) DUM. PhD Thesis. University of London.
- VALIO, I.F.M. e ROCHA, R.F. 1976. Physiological effects of steviol. *Z. Pflanzenphysiol.* 78:90-94.

- VALIO, I.F.M. e SCHWABE, W.W. 1968. Correlative growth in seedlings of Phaseolus vulgaris L. Inhibition of stem growth by the primary leaves. Ann. Bot. 42:263-268.
- VAN OCKELEN, H.A.; CAUBERGS, R. e DE GREEF, J.A. 1977 Effect of light treatment and endogenous growth hormones on α e β amylase activities in cotyledons of Phaseolus vulgaris L. Plant and Cell Physiol. 18:1029-1040.
- VAN STADEN, J. 1973. Changes in endogenous cytokinins of lettuce seed during germination. Physiol. Plantarum 28:222-227.
- VARNER, J.E. 1964. Gibberellic acid controlled synthesis of amylase in barley endosperm. Plant Physiol. 39:413-415.
- VARNER, J.E. e CHANDRA, G.R. 1964. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. Biochemistry 52:100-106.
- VARNER, J.E. e SCHIDLOVSKY, G. 1963. Intracellular distribution of proteins in pea cotyledons. Plant Physiol. 38:139-144.
- VARNER, J.E.; BALCE, L.V. e HUANG, C. 1963. Senescence of cotyledons of germinating peas, influence of axis tissue. Plant. Physiol. 38:89-92.
- VIANA, A.M. e MÉTIVIER, J.R. 1980. Changes in the levels of total soluble proteins and sugars during leaf ontogeny in Stevia rebaudiana Bert. Ann. Bot. (no prelo).
- VIGIL, E. e RUDDAT, M. 1973. Effect of gibberellic acid and actinomycin D on the formation and distribution of rough endoplasmic reticulum in barley aleurone cells. Plant Physiol. 51:549-558.
- WALKER; G.F. e HOPE, P.M. 1963. The action of amylases on starch granuls. Biochem. 86:452-462.

WEAVER, R.J. 1972. Plant growth substances in agriculture. W.H. Freeman and Company.

WEBB, D.P.; VAN STADEN, J. e WAREING, P.F. 1973. Seed dormancy in Acer: Changes in endogenous cytokinins, gibberellins and germination inhibitors during the breaking of dorm in Acer Saccharum. J. Exp. Bot. 24:105-116.

WILEY, L. e ASHTON, F.M. 1967. Influences of the embryonic axis on protein hydrolises in cotyledons of Cucurbita maxima Physiol. Planyatrum 20:688-696.

WRIGHT, D.J. e BOULTER, D. 1973. A comparasion of acid extracted globulin fractions and vicilin and legumin of Vicia faba. Phytochemistry 12:79-84.

YATSU, L.Y. e JACKS, T.J. 1968. Association of lysossomal activity with aleurone grains in plant seeds. Arch. Biochem. Biophys. 124:466-471.

YEMM, E.W. e WILLIS, A.J. 1954. Estimation of carbohydrates in extracts by anthrone. Biochem. J. 57:508-514.

YOMO, H. e SRINIVASEN, K. 1973. Protein breakdown and formation of protease in attached and detached cotyledons of Phaseolus vulgaris L. Pl. Physiol. 52:671-673.

YOMO, H. e TAYLOR, M.P. 1973. Histochemical studies on protease formation in the cotyledons of germinating beans. Planta 112:35-43.

YOMO, H. e VARNER, J.E. 1973. Control of the formation of amylases and proteases in cotyledons of germinating peas. Pl. Physiol. 51:708-713.

YOUNG, J.L.; HUANG, R.C.; VANECKO, S.; MARKS, J.D. e VARNER, J.E. 1960. Conditions affecting enzyme synthesis in cotyledons of germinating seeds. Plant. Physiol. 35:288-292.

YOUNG, J.L. e VARNER, J.E. 1959. Enzyme synthesis in the
cotyledons germinating seeds. Arch. Biochem. 84:71-78.