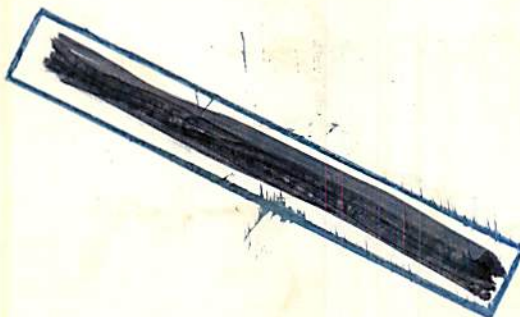


**MARLOS ALVES BEZERRA**



**EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM VÁRIOS ESTÁDIOS  
MORFOFISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
INICIAL DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)  
COM DIFERENTES GRAUS DE RESISTÊNCIA À SECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

**Prof. Dr. JOSÉ DONIZETI ALVES**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1996**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação  
da Biblioteca Central da UFLA

---

Bezerra, Marlos Alves

Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfofisiológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda ( *Vigna unguiculata* (L.) Walp ) com diferentes graus de resistência à seca / Marlos Alves Bezerra. -- Lavras : UFLA, 1996.

56 p.: il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia

1. Feijão-de-corda - déficit hídrico. 2. Germinação. 3. Desenvolvimento. 4. Plântula. 5. Seca-resistência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 635.65922

---

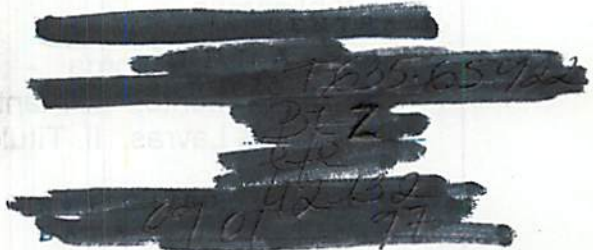
**MARLOS ALVES BEZERRA**

**EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM VÁRIOS ESTÁDIOS  
MORFOFISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
INICIAL DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)  
COM DIFERENTES GRAUS DE RESISTÊNCIA À SECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

**Prof. Dr. JOSÉ DONIZETI ALVES**



**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1996**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação  
da Biblioteca Central da UFLA

---

Bezerra, Marlos Alves

Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfofisiológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda ( *Vigna unguiculata* (L.) Walp ) com diferentes graus de resistência à seca / Marlos Alves Bezerra. -- Lavras : UFLA, 1996.

56 p.: il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia

1. Feijão-de-corda - déficit hídrico. 2. Germinação. 3. Desenvolvimento. 4. Plântula. 5. Seca-resistência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 635.65922

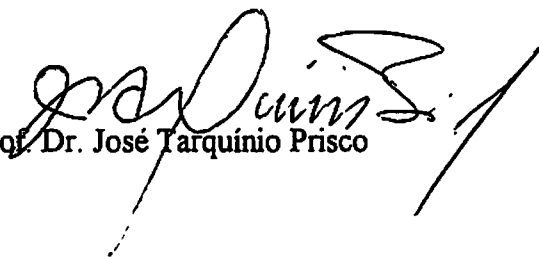
---

**MARLOS ALVES BEZERRA**

**EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM VÁRIOS ESTÁDIOS  
MORFOFISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL  
DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) COM  
DIFERENTES GRAUS DE RESISTÊNCIA À SECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 16 de agosto de 1996

  
Prof. Dr. José Tarquínio Prisco

  
Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

  
Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira  
(Presidente)

**Aos meus irmãos Kátia e Ivan,**

**A minha esposa Luciene,**

**Ao meu filho Thales,**

**Por servirem como porto seguro nos meus momentos de aflição**

**OFEREÇO**

**Aos meus pais Severino e Alzira,**

**maiores responsáveis por esse momento**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, senhor de todos os destinos.

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento de parte do projeto.

Ao Prof. José Donizeti Alves pela orientação, apoio e grande amizade.

Ao Prof. Luiz Edson Mota de Oliveira pela co-orientação, grande ajuda nos momentos decisivos e lição de profissionalismo.

Ao Prof. José Tarquínio Prisco pela co-orientação, valiosas sugestões e ensinamentos.

Ao Prof. Amauri Alves de Alvarenga pelas valiosas contribuições dadas.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará pela concessão do material vegetal.

Aos mestrandos Poliana, Josirley, Vespasiano, André, Marcel e Lucivane pelo apoio e amor fraterno de todos os momentos.

A todos os professores do Departamento de Biologia, em especial aos do Curso de Fisiologia Vegetal pela prestimosa colaboração e alegre convívio.

Aos amigos do mestrado Leonardo, Patrícia, Maguinho, Douglas, Gidelma, Evaristo, Rogério, Moemi, Valter, Neudes, Ana, Marcia, Vilma, Paulino, Ilka, Edgar, Denis.

Aos funcionários Izonel, Dartagnhan, Evaristo e Eustáquio pelas valiosas contribuições durante os trabalhos e alegre convivência.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



## **BIOGRAFIA**

**MARLOS ALVES BEZERRA**, filho de Severino Bezerra Sobrinho e Alzira Alves Bezerra, nasceu em Senador Pompeu - Ceará, no dia 26 de setembro de 1967.

Ingressou no Curso de Engenharia Agrônômica do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará no segundo semestre de 1988, tendo concluído o mesmo em dezembro de 1993.

Em março de 1994 iniciou o Curso de Pós-Graduação a nível de mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em agosto de 1996.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Material vegetal.....	3
2.2 Germinação e mobilização das reservas.....	4
2.3 Alterações fisiológicas decorrentes da baixa disponibilidade de água durante a germinação estabelecimento da plântula.....	8
3 METODOLOGIA.....	11
3.1 Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento.....	11
3.2 Implantação dos tratamentos.....	12
3.3 Quantificação dos açúcares, aminoácidos e amido.....	13
3.4 Quantificação das proteínas solúveis totais e da fração rica em proteínas “LEA”.....	15
3.5 Determinação das perdas eletrolíticas.....	16
3.6 Avaliação do vigor das plântulas.....	17

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Alterações bioquímicas durante os processos de germinação e estabelecimento inicial das plântulas.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.1 Proteínas e aminoácidos.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.2 Amido, açúcares solúveis totais e açúcares redutores.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3 Alterações bioquímicas durante os processos de germinação e estabelecimento inicial das plântulas, submetidas ou não ao déficit hídrico.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.1 Proteínas e aminoácidos.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.2 Amido, açúcares solúveis totais e açúcares redutores.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Alterações físicas e bioquímicas decorrentes da implantação do déficit hídrico nas variedades estudadas.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4.1 Teores de macro e micromoléculas.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4.2 Teores da fração rica em proteínas LEA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.3 Perdas eletrolíticas.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.4 Vigor das plântulas.....</b>	<b>43</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Sementes e plântulas nos diversos estádios de desenvolvimento.....	19
2	Teores de Proteínas solúveis totais ( A e B ) e de aminoácidos ( C e D ) nos eixos embrionários e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda embebidas em água destilada, nos diversos estádios de desenvolvimento.....	23
3	Teores de amido ( A e B ), açúcares solúveis totais ( C e D ) e açúcares redutores ( E e F ) nos eixos embrionários e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda embebidas em água destilada, nos diversos estádios de desenvolvimento.....	26
4	Teores de proteínas solúveis totais nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	30
5	Teores de aminoácidos nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	31
6	Teores de amido nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	35
7	Teores de açúcares solúveis totais nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	36
8	Teores de açúcares redutores nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	37

9	Teor da fração rica em proteínas LEA em relação ao teor de proteínas solúveis totais nos eixos de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	40
10	Perdas eletrolíticas ( $K_2$ ) nos eixos de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	42
11	Peso da matéria seca nas raízes (A e B) e parte aérea (C e D) de plântulas de feijão -de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	45
12	Comprimento (cm) das raízes (A e B) e parte aérea (C e D) de plântulas de feijão -de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento.....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Índice de Desenvolvimento (ID) de sementes e plântulas de feijão-de-corda em função do tempo de germinação e dos estádios de desenvolvimento.....	20

## RESUMO

**BEZERRA, Marlos Alves. Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfofisiológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda ( *Vigna unguiculata* (L.) Walp ) com diferentes graus de resistência à seca.\* Lavras: UFLA, 1996. 56p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).**

Objetivou-se caracterizar morfofisiologicamente o processo de germinação e estabelecimento das plântulas de feijão-de-corda, estudar o comportamento da espécie frente ao déficit hídrico, avaliando-se as mudanças físicas e bioquímicas que ocorrem nas sementes e plântulas. Para isso, sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) foram postas para germinar e em decorrência das mudanças morfológicas que ocorreram durante o processo de germinação e estabelecimento das plântulas, elegeu-se quatro estádios de desenvolvimento para a realização das análises bioquímicas, assim denominados: **Estádio 0 (zero)** - sementes quiescentes; **Estádio I** - sementes intumescidas; **Estádio II** - sementes com radículas emergidas até 2 cm; **Estádio III** - plântulas emergindo do solo. Ao longo dos estádios de desenvolvimento, sob condições normais, o teor de proteínas decresceu tanto na cultivar "vita 3" quanto na cultivar "vita 5", diferentemente dos teores de aminoácidos nos eixos embrionários das duas cultivares, que mostrou inicialmente um aumento, seguido de um decréscimo. Quanto aos teores de açúcares, o

---

\* Orientador: José Donizeti Alves. Membros da Banca: Luiz Edson Mota de Oliveira, Amauri Alves de Alvarenga e José Tarquínio Prisco.

amido decresceu nos cotilédones a partir do estágio I, acompanhado de um aumento nos açúcares solúveis totais nos eixos embrionários do estágio III. Os açúcares redutores aumentaram progressivamente nos eixos embrionários, ao longo dos quatro estágios de desenvolvimento. O déficit hídrico provocou uma redução no teor de proteínas, principalmente nos eixos embrionários, das duas cultivares. Quanto ao teor de aminoácidos, a maior redução em função do déficit hídrico se deu no estágio 0 das duas cultivares. Com relação ao teor de amido, o déficit hídrico, de um modo geral, acelerou sua degradação nos cotilédones, acarretando em um aumento no teor de açúcares solúveis totais nos eixos embrionários. A cultivar “vita 5”, quando mantida sob déficit hídrico, apresentou inicialmente um metabolismo mais acelerado, bem como um maior aumento do teor de proteínas LEA, quando comparada à cultivar “vita 3”. Não se observou aumento das perdas eletrolíticas em função do déficit hídrico nas duas cultivares e o crescimento da parte aérea das plântulas foi mais afetado pela falta d’água que o crescimento das raízes.



## **ABSTRACT**

### **EFFECTS OF WATER DEFICIT ON SEVERAL MORPHOPHYSIOLOGICAL STAGES OF GERMINATION AND EARLY DEVELOPMENT OF COWPEA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) SEEDLINGS WITH DIFFERENT DEGREES OF DROUGHT RESISTENCE.**

Morphophysiological characterizing the process of germination and establishment of cowpea seedling was aimed at, in addition to investigating the behavior of the species in face to water deficit, by evaluating the physical and biochemical changes which take place in seeds and seedlings. So, cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) were placed to germinate and due to the morphological changes which occur during the process of germination and establishment of the seedlings, were selected four developmental stages for the biochemical analyses so named: **stage 0 (zero)** - quiescent seeds; **stage 1** - moistened seeds; **stage 2** - seeds with radicles emerged up to 2 cm; **stage 3** - seedlings emerged from the soil. Along the developmental stages, under normal conditions, protein content decreased both in the cultivar "vita 3" and cultivar "vita 5", differently from the contents of aminoacids in the embryonic axes of the two cultivars, which showed at first an increase followed by a decrease. Concerning sugar contents, starch decreased in cotyledons from the stage I, accompanied by a rise in total soluble sugars in the cotyledons of stage III. Reducing sugars gradually increased in embryonic axes, along the four developmental stages. Water deficit caused a fall in protein content, chiefly in the embryonic axes of the two cultivars.

Concerning starch content, water deficit, in a general manner, speeded its breakdown in cotyledons, bringing about an increased total soluble sugar content in embryonic axes. The cultivar "vita 5", when held under water deficit, showed at first a more accelerated metabolism, as well as greater increase of first content of LEA proteins, as compared with cultivar "vita 3". Increase of electrolytical losses in function of the water deficit not occurred in the two cultivars and the growth of the shoot of the seedlings was affected the most by water lack than the growth of roots.

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda ( *Vigna unguiculata* (L.) Walp ), uma das culturas mais importantes para o trópico semi-árido e úmido, é a principal fonte de proteínas vegetal na região Nordeste do Brasil, constituindo-se na mais notável cultura de subsistência do sertão semi-árido nordestino e em outras áreas isoladas da Amazônia ( Araujo e Watt, 1988 ). Esta cultura representa ainda cerca de 20 % do total da produção brasileira de feijão. Apesar de sua comprovada importância, de apresentar qualidades nutricionais superiores às dos feijões comuns e de seu custo de produção relativamente baixo, os níveis de produtividade da cultura no Nordeste brasileiro, que responde por cerca de 95 % da produção brasileira de feijão-de-corda ( Araujo e Watt, 1988 ), são bem inferiores aos do feijão. Esta baixa produtividade, na maioria das vezes, se deve às condições adversas do meio ambiente, caracterizado por apresentar clima quente semi-árido, com baixa precipitação anual.

Devido a grande importância dessa cultura, faz-se necessário um esforço adicional em pesquisas que visem elevar sua produtividade. Nesse sentido, torna-se indispensável o conhecimento das estratégias apresentadas pelas plantas em resposta aos estresses ambientais, destacando-se mudanças bioquímicas e fisiológicas das sementes e plântulas sob estresse hídrico.

Objetivou-se nesse sentido, caracterizar morfofisiologicamente o processo de germinação e estabelecimento das plântulas de feijão-de-corda, estudar o comportamento da

**espécie frente ao déficit hídrico, com base nas alterações físicas e bioquímicas que ocorrem nas sementes e plântulas.**

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Material vegetal

O feijão-de-corda ( *Vigna unguiculata* (L.) Walp ), leguminosa comestível com alto teor protéico é uma espécie extremamente rústica e tolerante a altas temperaturas e à seca ( Araujo e Watt, 1988 ), sendo cultivado predominantemente nas regiões de clima quente ( úmidas ou semi-áridas ), com sua origem provavelmente associada ao continente africano ( Ng e Maréchal, 1985 ).

Apesar de ser cultivada basicamente para produção de grãos visando a alimentação humana, pela sua rusticidade e capacidade de se desenvolver em solos de baixa fertilidade é uma espécie que pode ser utilizada também como adubo verde na recuperação de solos naturalmente pobres em fertilidade, ou esgotados pelo uso intensivo ( Araujo e Watt, 1988 ).

No Brasil, representa 20% do volume total da produção de feijão, sendo responsável por cerca de 26% da área total plantada com feijão. Em alguns estados como Maranhão, Ceará e Amazonas chega a representar de 95 a 100% do total das áreas plantadas com feijão ( Teixeira, May e Santana, 1988 ).

Dentre as cultivares utilizadas, a “vita 3” e a “vita 5”, lançadas pelo IITA em Ibadan na Nigéria são reconhecidas internacionalmente e apresentam diferentes níveis de tolerância à

salinidade e déficit hídrico ( Singh e Rachie, 1985 ). A cultivar “vita 3” é reconhecidamente tolerante à salinidade, enquanto a cultivar “vita 5” mostra-se sensível. Em estudos realizados no CNPAF/EMBRAPA, a cultivar “vita 3” também foi considerada como bastante promissora para o cultivo sob condições de baixa disponibilidade de água ( Guimarães, Watt e Araújo, 1982 ).

## **2.2 Germinação e mobilização das reservas**

O processo germinativo tem início com a absorção de água pela semente e vai até o início da alongação do eixo embrionário. A germinação *stricto sensu* não inclui a mobilização de reservas para o crescimento do seedling ( Bradford, 1995 e Bewley e Black, 1994 ).

Após a embebição de água pelas sementes, passo inicial e essencial para a germinação, estas passam para um estágio dinâmico onde o metabolismo é rapidamente retomado acarretando mudanças morfológicas e fisiológicas ( Ashton, 1976 ). Esse rápido metabolismo que inicia após a alongação do eixo embrionário ( Xu e Bewley, 1995 ), resulta da utilização das reservas, formadas predominantemente por carboidratos, proteínas e lipídeos ( Bewley e Black, 1994; Karunagaran e Rao, 1991; Ashton, 1976 e Harris, Chrispeels e Boulter, 1975 ) que se encontram armazenadas nos cotilédones de plantas dicotiledôneas ou no endosperma das monocotiledôneas. Os produtos da hidrólise serão então utilizados pelo eixo embrionário para a síntese de protoplasma, de componentes estruturais e para promover o seu subsequente crescimento ( Callis, 1995; Karunagaran e Rao, 1991 e Ashton, 1976 ).

Em plantas de soja, que igualmente ao feijão-de-corda, apresenta germinação epígea, os cotilédones podem desempenhar função fotossintética, antes da abertura das folhas primárias ( Harris, Smith e Mackender, 1986 e Smith, 1983 ), bem como atuar como sítio de incorporação

de nitrogênio ( Bergareche et al, 1994; Rajasekhar e Mohr, 1986 e Rajasekhar, Gowri e Campbell, 1988 ). As funções dos cotilédones no processo germinativo dependem do período em que os mesmos permanecem conectados à plântula e de sua área de superfície ( Machado, Williams e Tucker, 1974 e Lovell e Moore, 1970 ).

As proteínas de reserva estão depositadas dentro de organelas celulares especiais denominadas corpos protéicos. A deposição dessas proteínas tem regulação espacial e temporal ( Rerie, Whitecross e Higgins, 1991; Olsen, Jakobsen e Schmelzer, 1990 e Murphy, Cummins e Ryan, 1989 ). O processo de degradação dos corpos protéicos é regulado por enzimas hidrolíticas que podem estar armazenadas dentro das próprias organelas já nas sementes quiescentes ou que são sintetizadas “de novo” durante a germinação ( Van der Wilden e Chrispeels, 1983; Van der Wilden, Herman e Chrispeels, 1980 e Mayer e Shain, 1974 ).

As proteínas dos cotilédones, após a hidratação da semente são hidrolizadas por enzimas proteolíticas, produzindo aminoácidos e amidas que em grande parte são transportados para o eixo em desenvolvimento, onde são utilizados para síntese de várias enzimas e de proteínas estruturais ( Dunaevsky e Belozersky, 1993 e Davies e Chapman, 1980 ). Muitos desses aminoácidos sofrem ainda desaminação ( Ashton, 1976 ) e/ou são interconvertidos.

O conhecimento atual do processo de degradação das proteínas é de que ele ocorre em etapas/fases, com uma clivagem endoproteolítica inicial mais específica e a subsequente hidrólise para aminoácidos por endo e exopeptidases menos específicas ( Callis, 1995 ). Trabalhando com cevada, Rastogi e Oaks (1986) observaram que uma endoprotease inicial ( endoprotease 1 ) é induzida quando a água é introduzida no sistema, produzindo grandes fragmentos de polipéptidos que por sua vez são clivados por uma outra endoprotease ( endoprotease 2 ) induzida na presença de GA<sub>3</sub>. Os produtos dessa hidrólise são então desdobrados por exo e dipeptidases, em

aminoácidos. Bewley e Black (1994) denominaram a(s) endoprotease(s) inicial(is) de proteinase(s) A, observando ainda que na maioria das vezes, elas são endoproteases ácidas.

Em monocotiledôneas, particularmente gramíneas, o controle da quebra das substâncias de reserva vem sendo bastante estudado. O ácido giberélico formado na camada de aleurona ou no embrião estimula a síntese de enzimas hidrolíticas na camada de aleurona, que são posteriormente liberadas no endosperma, hidrolizando as proteínas armazenadas ( Dunaevsky e Belozersky, 1993 e Davies e Chapman, 1980 ). Nas dicotiledôneas o processo é mais complexo. Em abóbora, o desenvolvimento da atividade de proteases e dipeptidases é controlado pelo nível de hormônios endógenos originados no eixo embrionário. Entretanto, a remoção do eixo não elimina completamente o aumento da atividade das dipeptidases ( Sze e Ashton, 1971 ). Já em cotilédones de girassol, o efeito do eixo pode ser substituído pela utilização exógena de citocinina ( Allen, Arnott e Nessler, 1984 ). No caso de *Phaseolus vulgaris*, o eixo não possui influência ativa na atividade proteolítica nos cotilédones ( Yomo e Srinivasan, 1973 ).

Em feijão-de-corda, proteinases e peptidases presentes na semente quiescente ou originadas por síntese “de novo” nos cotilédones durante a germinação, são responsáveis pela mobilização das proteínas nos cotilédones ( Wynn e Murray, 1985; Ainouz e Benevides, 1982; Ainouz, Benevides e Freitas, 1981; Chrispeels, Baumgartner e Harris, 1976 e Prisco, Ainouz e Melo, 1975 ). O início da mobilização das proteínas nos cotilédones ocorre nos tecidos adjacentes ao hilo, com a fusão de vesículas citoplasmáticas aos corpos protéicos ( Harris, Chrispeels e Boulter, 1975 ).

No que diz respeito ao metabolismo dos carboidratos, sabe-se que o eixo embrionário influencia a mobilização dos carboidratos nos cotilédones ( Karunagaran e Rao, 1991 ). Diferenças na taxa e nas vias ( fosforolítica ou amilolítica ) da mobilização do amido e a natureza dos



produtos hidrolizados tem sido observadas em diferentes espécies. Juliano e Varner (1969) concluíram que a  $\alpha$ -amilase é a enzima mais envolvida na degradação inicial do amido nos cotilédones de ervilha, diferentemente de Bewley e Black (1994) que encontraram primeiro atividade fosforolítica na degradação do amido. Por outro lado, Mayer e Shain (1974) concluíram que em cotilédones de ervilha, ocorrem quebras amilolíticas e fosforolíticas do amido. A degradação do amido em sementes de ervilha é bifásica, com baixa taxa de degradação nos primeiros cinco a seis dias, seguido por uma fase rápida de degradação ( Bewley e Black, 1994 e Juliano e Varner, 1969) . Durante os primeiros dias de germinação, nos quais acontece a degradação lenta do amido, ocorre um aumento de sacarose proveniente da degradação de estaquiose e rafinose ( Monerri, Garcia-Luis e Guardiola, 1986 e Lee e Shallenberger, 1969 ). Resultados semelhantes foram encontrados em soja, milho e ervilha por Koster e Leopold (1988).

Em feijão-de-corda, ocorre um aumento inicial de açúcares livres nos cotilédones de sementes germinando, seguido de decréscimo progressivo. O amido nos cotilédones decresce durante todo o período de germinação e crescimento do eixo embrionário ( Prisco, Eneas Filho e Gomes Filho, 1981 ). O padrão de decréscimo no peso, conteúdo de amido e de carboidratos solúveis totais nos cotilédones indicam a translocação dos produtos da hidrólise para o eixo embrionário, onde são utilizados na respiração ( Rosenberg e Rinne, 1987 e Harris, Smith e Mackender, 1986 ) ou em outros processos metabólicos.

Apesar de se encontrar amilases em cotilédones de sementes quiescentes, a grande maioria dessas enzimas são sintetizadas “de novo” ( Ferreira, Dietrich e Handro, 1979 e Yomo e Varner, 1973 ). Em *Phaseolus vulgaris*, o controle da formação das amilases pode ser realizado por giberelinas ( Dale, 1969 ) ou citocininas ( Gepstain e Ilan, 1970 ).

### **2.3 Alterações fisiológicas decorrentes da baixa disponibilidade de água durante a germinação e estabelecimento da plântula**

A água possui propriedades físicas que a tornam um solvente biológico ideal, atuando ainda como estabilizador da estrutura das membranas ( Koster e Leopold, 1988 ) e controlando a atividade metabólica das plantas ( McIntyre, 1987 e Hergaty, 1978 ).

O estresse hídrico pode produzir profundos efeitos metabólicos nas plantas, alterando vários processos fisiológicos, como crescimento de células, síntese de parede, metabolismo de nitrogênio e clorofila, interferindo inclusive a nível de substâncias de crescimento. A irreversibilidade dessas alterações vai depender da duração e severidade do estresse, do genótipo utilizado e do estágio de desenvolvimento da planta ( Bray, 1993 e Kramer, 1983 ).

Os tecidos de plantas mostram várias alterações metabólicas em resposta ao déficit hídrico, sendo algumas de caráter adaptativo. Essas alterações podem ocorrer nos seguintes níveis: i) distúrbio nas vias metabólicas levando a um acúmulo ou perda de metabólitos como carboidratos, ácidos orgânicos, compostos quaternários de amônia, ABA e aminoácidos; ii) alterações na atividade das enzimas, e iii) trocas no padrão da síntese protéica ( Marur, Sodek e Magalhães, 1994 ).

Como as respostas ao déficit hídrico estão associadas às trocas no turgor da célula, que por sua vez afetam a estrutura das membranas, o maquinário de síntese de proteínas também é afetado devido a degradação ou perda de poliribossomos ( Dell'aquila, 1992 ). Uma correlação direta entre a capacidade de sintetizar proteínas e a absorção de água foi encontrada por Prisco e O'Leary (1970) no eixo embrionário de sementes de feijão-de-corda (*Phaseolus vulgaris*). Por outro lado, vários mRNAs que codificam proteinases, especialmente proteinases cisteicas, se

acumulam quando os tecidos são expostos a diferentes estresses ambientais ( Callis, 1995 ). mRNAs que codificam duas diferentes proteinases acumulam-se em plântulas de *Arabidopsis* ( Koizumi et al, 1993 ) e de ervilha ( Guerrero, Jones e Mullet, 1990 ) submetidas a estresse salino ou hídrico. Um efeito inibitório do estresse salino na mobilização das proteínas de reserva, resultado da inibição da translocação dos produtos da hidrólise para o eixo embrionário, foi encontrado por Prisco e Vieira (1976) durante a germinação de sementes de feijão-de-corda.

Além das proteínas, as sementes ortodoxas acumulam açúcares para se prevenir do estresse hídrico ( Blackman, Obendorf e Leopold, 1995 ). Os constituintes hidroxil dos açúcares, especialmente da sacarose, repõem a hidratação da membrana provavelmente por ligarem-se através de pontes de hidrogênio às extremidades do grupo fosfolipídeo da membrana ( Blackman, Obendorf e Leopold, 1992; Blackman et al, 1991 e Koster e Leopold, 1988 ). Durante a germinação de sementes de feijão-de-corda, o estresse salino inibe a mobilização do amido ( Prisco, Eneas Filho e Gomes Filho, 1981 ).

Várias plantas apresentam um mecanismo conhecido como ajustamento osmótico ( Raggi, 1994 e Bray, 1993 ), resultante do acúmulo de solutos osmoticamente ativos durante o déficit hídrico, reduzindo assim o potencial osmótico celular. Esses solutos são, em geral, açúcares solúveis como sacarose, aminoácidos como prolina, além de glicinobetaina ( Raggi, 1994 e Veeranjaneyulu e Kumari, 1989 ).

As plântulas se adaptam ao estresse hídrico induzindo genes reconhecidamente protetores das estruturas celulares contra os efeitos deletérios da perda de água. Estes genes, freqüentemente chamados de LEA ( Late Embryogenesis Abundant ) ( Espelund et al, 1995 e Bray, 1993 ), são expressados durante as fases de maturação e dessecação da semente ( Baker, Steele e Dure, 1988 ), podendo ser expressados em tecidos de sementes em processo de

germinação, sob condições de déficit hídrico ( Blackman et al, 1991 ) ou em sementes tratadas com ABA exógeno ( Skriver e Mundy, 1990 ). Os genes LEA são formados por seis grupos, que participam desde o seqüestro de íons, passando pelo aumento da capacidade de ligação com a água, pela preservação da estrutura de membranas até a atuação como uma função chaperona, inibindo a ação de proteases ( Bray, 1993 ).

A contração das células durante a desidratação das sementes pode resultar em perdas do material das membranas ( Vertucci e Farrant, 1995 ). A perda de área da superfície celular leva a uma perda de lipossomos ( Johnson-Flanagan e Singh, 1986 ) e ao aumento da razão área da superfície/volume. Devido a estes fatores, ocorre um aumento na perda de eletrólitos do citoplasma, levando vários autores a concluírem que o sítio primário das injúrias causadas pelo déficit hídrico seja a nível de membrana ( Senaratna e McKersie, 1983 ). Entretanto, o aumento das perdas eletrolíticas pode ser resultado de uma ruptura física das células ( Wiest e Steponkus, 1978 ) e/ou de trocas na permeabilidade ou outras trocas funcionais nas membranas ( Palta e Ph, 1980 e Volger, Heber e Berzborn, 1978 ).

O déficit de água influencia o crescimento das plântulas, produzindo efeitos em vários parâmetros, como a condutividade hidráulica dos tecidos ( McIntyre, 1987 ), as propriedades osmóticas das células ( Cosgrove, 1981 ) e as propriedades da parede celular ( Pritchard, Tomos e Jones, 1987 ). Sob déficit hídrico, o alongamento da raiz é menos inibido que o crescimento da parte aérea, e isto é considerado um mecanismo de adaptação ( Wu et al, 1994 ). Os autores concluíram ainda que a manutenção do alongamento da raiz sob déficit hídrico está associado ao aumento da atividade da enzima xiloglucana-endotransglicolase, responsável pela separação das moléculas de xiloglucana das microfibrilas de celulose da parede celular.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento**

Sementes de feijão-de-corda ( *Vigna unguiculata* (L.) Walp ) cv. pitiúba que se encontravam armazenadas a uma temperatura de  $10 \pm 1$  °C no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará foram utilizadas neste trabalho.

Os processos germinativo e de estabelecimento das plântulas ocorreu em bandejas plásticas de 30x18x6,5cm contendo como substrato vermiculita e água na proporção de 2:1 (v/v). A semeadura foi feita à profundidade de 2,0cm com o auxílio de um marcador de covas, constituído de um tabuleiro de madeira contendo 50 furadores de 2,0cm de comprimento e 1,0cm de diâmetro, espaçados entre si com 2,0cm entre linhas e 1,5cm dentro das linhas. Após a semeadura as bandejas contendo as sementes foram mantidas em câmara de crescimento programada para  $25 \pm 1$ ° C de temperatura e fotoperíodo de 12h. Visando compensar as perdas evaporativas, as bandejas foram pesadas diariamente e a água evaporada, repostas. A semeadura foi realizada diariamente, de modo que por ocasião da colheita foram obtidas plântulas com 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 e 1 dias após a semeadura. Utilizou-se seis repetições para cada dia de semeadura. O material colhido foi separado para as caracterizações morfológicas.

Calculou-se ainda um Índice de Desenvolvimento ( **ID** ) com base no tempo de germinação e estágio de desenvolvimento das plântulas de acordo com Prisco (1988):

$$\mathbf{ID} = \sum ( E_i \times n_i ) / \sum n_i , \text{ sendo:}$$

$E_i$  = Estádio de desenvolvimento

$n_i$  = número total de sementes ou plântulas com a característica do estágio  $E_i$ .

Em decorrência das mudanças morfológicas que ocorreram durante os processos de germinação e estabelecimento das plântulas, determinou-se, a princípio, dez estádios de desenvolvimento. Para a aplicação dos tratamentos e posteriores análises, elegeu-se apenas os quatro estádios de desenvolvimento iniciais, nos quais os cotilédones apresentaram-se ainda fechados e dentro do solo. Estes estádios foram: **0 (zero)** - sementes quiescentes (figura 1); **I** - sementes intumescidas (figura 1); **II** - sementes com radículas emergidas até 2 cm (figura 1); **III** - plântulas emergindo do solo (figura 1).

### **3.2 Implantação dos tratamentos**

As sementes de feijão-de-corda cvs. vita 3 e vita 5 foram colocadas para germinar como descrito anteriormente, sendo que bandejas diferentes foram destinadas para cada estágio de desenvolvimento.

Quando as sementes e plântulas das duas cultivares apresentaram as características pré-estabelecidas, foram separadas pelos estádios de desenvolvimento. As sementes e plântulas foram então colocadas entre duas folhas de papel de germinação ( 28 x 38cm ) umedecidas com água ou

solução de polietilenoglicol 6000 ( PEG 6000 ), enroladas e colocadas em cubetas contendo as respectivas soluções e levadas à sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas por 24 horas. Os tratamentos aplicados foram os seguintes.

$T_1$  = sementes semeadas em papel umedecido com água destilada ( 0 MPa )

$T_2$  = sementes semeadas em papel umedecido com solução de PEG 6000 com  $\Psi$ s de  
- 0,6 MPa

A solução osmótica foi preparada de acordo com Michel (1983), utilizando-se 218,14g de PEG 6000 / Kg  $\text{H}_2\text{O}$ .

Em todas as análises que serão descritas a seguir, para cada tratamento em cada estágio de desenvolvimento, utilizou-se 5 repetições de 20 sementes/plântulas, exceto na determinação das perdas eletrolíticas, onde se utilizou apenas 10 plântulas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

### **3.3 Quantificação dos açúcares, aminoácidos e amido**

Decorridas as 24 horas de tratamento, as sementes/plântulas foram separadas em eixo e cotilédones. Em seguida as amostras foram pesadas, retirando-se 1g de matéria fresca que foi fragmentada, colocada em 10 ml de etanol 80% fervente e em seguida armazenadas em geladeira a  $10 \pm 1^\circ \text{C}$ . Posteriormente, as amostras mergulhadas no etanol 80% foram maceradas em almofariz e centrifugadas a 2000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante recolhido. O resíduo foi ressuspenso em etanol 80% fervente e novamente centrifugado, como descrito anteriormente. Completou-se então o volume para 15 ml com etanol 80% fervente. A partir desse extrato, foram

então retiradas amostras para quantificação de açúcares solúveis totais pela reação com antrona ( Hodge e Hofreiter, 1962 ), que consistiu na adição de 2,0 mL do reagente de antrona a 1,0 mL do extrato, seguido de ebulição em banho-maria por três minutos e posterior leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. Os açúcares redutores foram dosados pelo método do dinitrosalicilato (DNS) de acordo com Miller (1959), utilizando 1,5 mL do extrato + 1 mL de DNS, seguido de ebulição em banho-maria por cinco minutos e posterior leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Os aminoácidos livres foram quantificados pelo método da ninhidrina (Cocking e Yemm, 1954), utilizando-se 1,0 mL do extrato juntamente com 0,5 mL de tampão citrato, 0,2 mL do reagente de ninhidrina e 1,0 de KCN 2% e posterior fervura em banho-maria a 100° C por 20 minutos seguido da adição de 1,3 mL de etanol 60% e leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Na determinação de ambos os açúcares, utilizou-se glicose como padrão, enquanto que na determinação dos aminoácidos livres o padrão empregado foi a glicina. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  da molécula por grama de matéria seca.

O precipitado foi ressuspenso com etanol 10%. Após nova centrifugação, como descrito anteriormente, o sobrenadante foi descartado e o novo precipitado foi novamente ressuspenso com ácido perclórico 30%, centrifugado a 2000 g por 20 minutos e o sobrenadante recolhido para quantificação do amido pelo método da antrona. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  da molécula por grama de matéria seca.



### 3.4 Quantificação de proteínas solúveis totais e da fração rica em proteínas “LEA”

Decorridas as 24 horas de tratamento, as plântulas foram separadas em eixo embrionário e cotilédones e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi realizada a extração das proteínas em almofariz de acordo com Blackman et al (1991), utilizando-se 1,0g de matéria vegetal fresca e 4,0ml de um extrator constituído de Tris-HCl (50 mM; pH 7,5 ), de NaCl (500 mM), de MgCl<sub>2</sub> (5 mM) e de phenilmetilsulfonil fluorido (1 mM), seguido de centrifugação a 16.000 g por 10 minutos a 0 ° C. Descartou-se o precipitado e recolheu-se o sobrenadante. Do sobrenadante, foi retirado cerca de 200 µl para quantificação das proteínas solúveis totais de acordo com Bradford (1976), enquanto o restante foi incubado a 80° C por 10 minutos e novamente centrifugado a 16.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Novamente recolheu-se o sobrenadante de onde as alíquotas foram retiradas para a quantificação da fração rica em proteínas “LEA” nos eixos embrionários. A quantificação das proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se 5,0 mL do reagente de “coomassie blue G-250” adicionado a 100 µL do extrato. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Como padrão foi utilizado soroalbumina bovina (BSA). Os resultados das proteínas solúveis totais foram expressos em mg da proteína por grama de matéria seca, enquanto a fração rica em proteínas LEA foi expressa como a razão entre o teor da fração rica em proteínas LEA e o teor de proteínas solúveis totais.

### 3.5 Determinação das perdas eletrolíticas

Decorridas as 24 horas de tratamento, as plântulas de cada tratamento em cada estágio de desenvolvimento foram separadas em eixo embrionário e cotilédones. Os eixos foram incubados em água desionizada a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  ( 10 órgãos / 5 mL ) e as perdas eletrolíticas monitoradas pela medição da condutividade elétrica do líquido de imersão a intervalos de 2 minutos durante 40 minutos, utilizando-se um condutivímetro TE - 701 da DIGIMED. Para determinação da condutividade máxima, os tecidos e o líquido de imersão foram incubados a  $100^\circ\text{C}$  por 10 minutos e, em seguida, mantidos em freezer por 24 horas. Após o descongelamento, à temperatura ambiente, fez-se a leitura ( Earnshaw, 1993).

As perdas eletrolíticas foram expressas de acordo com Blackman, Obendorf e Leopold (1995), pela seguinte equação:

$$C_n / C_o = 1 - K_1 e^{-k_2 t} \text{ onde;}$$

$C_n$  = condutividade do líquido de imersão ( $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) no tempo  $t$  (min)

$C_o$  = condutividade máxima do líquido de imersão ( $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$K_1$  = constante, sendo igual a unidade

$K_2$  = perdas eletrolíticas ( $\times 10^{-2}$ )( $\text{min}^{-1}$ )

### **3.6 Avaliação do vigor das plântulas**

Após a aplicação dos tratamentos, as plântulas foram transferidas para rolos de papel de germinação umedecidos com água destilada, os quais foram colocados em cubetas contendo água destilada e levadas para sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , e fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram por 7 dias. Após esse tempo, avaliou-se o comprimento das raízes e parte aérea das plântulas, bem como os respectivos pesos da matéria seca.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento**

No estágio 0 enquadram-se as sementes quiescentes, ou seja, sementes que ainda não absorveram água do solo (Figura 1). Como resultado da absorção de água, as sementes atingiram o estágio I (Figura 1), caracterizado pelo intumescimento das mesmas, sem a emergência da radícula. Com a ativação do metabolismo das sementes, pela embebição de água, o embrião se desenvolveu, provocando a emergência da radícula, fato que caracterizou o início do estágio II (Figura 1) que se estendeu até a radícula atingir 2,0 cm de comprimento, porém sem emergir do solo. O estágio III (Figura 1) se caracterizou por apresentar plântulas com radícula maior que 2,0 cm, sendo o limite superior evidenciado pela emergência dos cotilédones do solo. No estágio IV (Figura 1), o hipocótilo primeiramente se encontra na forma de gancho, passando para a posição horizontal até atingir a posição vertical, isto tudo ocorrendo com as folhas ainda dentro dos cotilédones. Com a continuação do processo de desenvolvimento da plântula, as folhas foram lançadas para fora dos cotilédones, estando ainda enroladas, ficando na posição vertical ou inclinada (estádio V)(Figura 1). As plântulas atingiram o estágio VI (Figura 1) quando suas folhas cordiformes primárias apresentavam-se na posição horizontal e não abertas. Com o processo de desenvolvimento elas se abriram de forma a permitir a máxima interceptação de energia radiante (estádio VII)(Figura 1) completando assim o estabelecimento das mesmas.

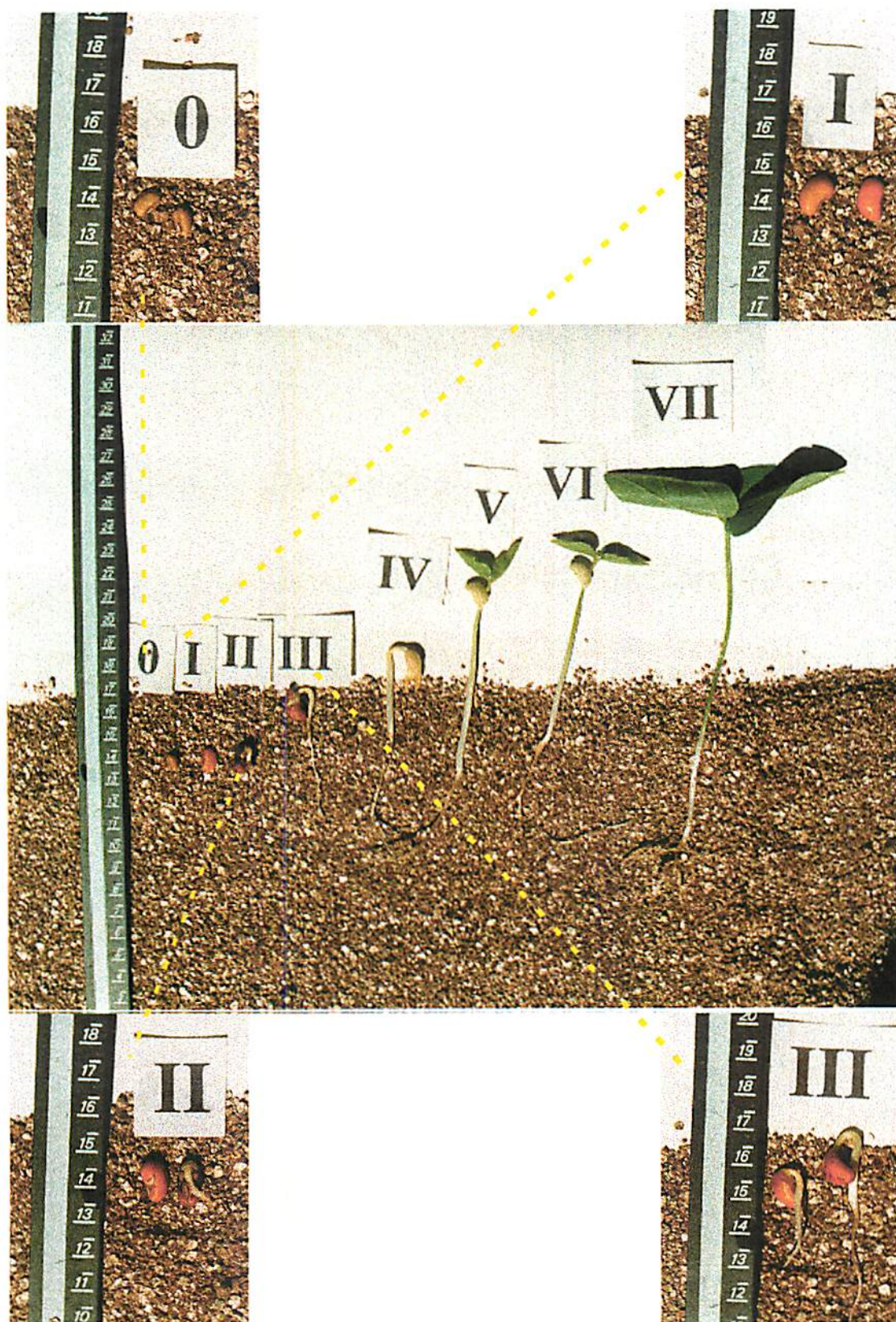


FIGURA 1 - Sementes e plântulas nos diversos estádios de desenvolvimento.

O Índice de Desenvolvimento (Tabela 1) baseado no tempo e nos estádios de desenvolvimento das plântulas apresentado no primeiro dia após a semeadura foi de 1,0 indicando que todas as sementes se encontravam no estágio I. No segundo dia após a semeadura o ID apresentado foi de 1,34 revelando que 66% das sementes se encontravam no estágio I e 34% se encontravam no estágio II. Para o terceiro dia após a semeadura o ID encontrado foi de 2,34 mostrando que 66% das plântulas se encontravam no estágio II e 34% se encontravam no estágio III. Um ID de 3,75 foi encontrado no quarto dia após a semeadura, revelando que 25% das plântulas se encontravam no estágio III e 75% se encontravam no estágio IV. Com cinco dias de semeadura as plântulas já apresentaram ID de 5,44 indicando que 56% se encontravam no estágio V e 44% das mesmas se encontravam no estágio VI. No sexto dia após a semeadura o ID alcançado foi de 6,06, mostrando que 94% das plântulas estavam no estágio VI e apenas 6% se encontravam no estágio VII.

TABELA 1. Índice de Desenvolvimento (ID) de sementes e plântulas de feijão-de-corda em função do tempo de germinação e dos estádios de desenvolvimento.

Dias após a semeadura	% dos Estádios de desenvolvimento							Índice de Desenvolvimento	
	0	I	II	III	IV	V	VI		VII
0	100								0,00
1		100							1,00
2		66	34						1,34
3			66	34					2,34
4				25	75				3,75
5						56	44		5,44
6							94	6	6,06

## **4.2 Alterações bioquímicas durante os processos de germinação e estabelecimento inicial das plântulas.**

### **4.2.1 Proteínas e aminoácidos.**

No estágio 0, o processo de embebição de água levou a uma síntese de proteínas nos eixos embrionários das duas cultivares (Figuras 2A e 2B), fato comprovado ao se observar a proporção de proteínas entre o eixo e os cotilédones de 1:1, enquanto em sementes quiescentes esta proporção é de pouco mais de 1:2 ( Ainouz, Benevides e Freitas, 1981 ).

Analisando-se a cultivar “vita 3” entre os estádios de desenvolvimento 0 e I, observou-se uma diminuição do teor de proteínas no eixo embrionário (Figura 2A) com um concomitante aumento do teor de aminoácidos (Figura 2C), resultado de uma taxa de degradação da proteína maior que a de síntese. Nos cotilédones, tanto os teores de proteínas quanto de aminoácidos livres mantiveram-se estáveis. Na passagem do estágio I para o estágio II, o teor de proteínas continuou o mesmo nos cotilédones e no eixo (Figura 2A). No entanto, ocorreu uma diminuição no teor de aminoácidos do eixo e um aumento nos cotilédones (Figura 2C). Os resultados nos levam a supor que a exemplo de pepino ( Bergareche et al, 1994 ), mostarda ( Rajasekhar e Mohr, 1986 ) e abóbora ( Rajasekhar, Gowri e Campbell, 1988 ), nos cotilédones das plântulas do estágio II ocorreu uma síntese de aminoácidos resultado provavelmente de uma atividade da enzima redutase do nitrato, enquanto no eixo aparentemente ocorreu a incorporação de aminoácidos em moléculas estruturais, responsáveis pelo crescimento do mesmo ( Dunaevsky e Belozersky, 1993 e Ashton, 1976 ). Finalmente, quando se realizou as análises entre os estádios II e III, verificou-se que não ocorreram diferenças significativas para os teores de proteínas (Figura 2A) e para os teores de

aminoácidos (Figura 2C) nos eixos e cotilédones, sugerindo que entre estes estádios, o padrão de hidrólise e mobilização das moléculas analisadas seja semelhante.

Para a cultivar “vita 5”, entre os estádios 0 e I, não encontrou-se diferenças entre os teores de proteínas no eixo e, obteve-se um aumento nos cotilédones (Figura 2B). Entretanto, o teor de aminoácidos aumentou tanto no eixo quanto nos cotilédones, sendo este aumento mais conspícuo no eixo (Figura 2D), o que pode ser atribuído a um aparecimento de proteínas solúveis que se encontravam dentro de corpos protéicos pré-existentes ( Melo, 1994 ) que foram degradados. Nesta degradação, acredita-se que primeiramente esteja envolvido uma endoprotease (endoprotease 1) que produziu grandes polipeptídeos, que por sua vez necessitaram de uma segunda endoprotease (endoprotease 2) para produzir os polipetídeos que foram finalmente degradados por exo e dipeptidases ( Rastogi e Oaks, 1986 ). Esta segunda endoprotease supostamente não estava atuando no estádio 0. Os dados apresentados pelas análises das proteínas e aminoácidos na passagem do estádio I para o estádio II mostraram-se semelhantes aos da cultivar “vita 3”, exceto o teor de aminoácidos dos cotilédones que não teve aumento (Figuras 2B e 2D). Semelhantemente à cultivar “vita 3”, quando se realizou as análises entre os estádios II e III, verificou-se que não ocorreram diferenças significativas para os teores de proteínas e para os teores de aminoácidos nos eixos e cotilédones, exceto o teor de aminoácidos no eixo que apresentou um aumento, resultado de uma leve diminuição do teor de proteínas nos cotilédones da variedade mencionada (Figuras 2B e 2D).



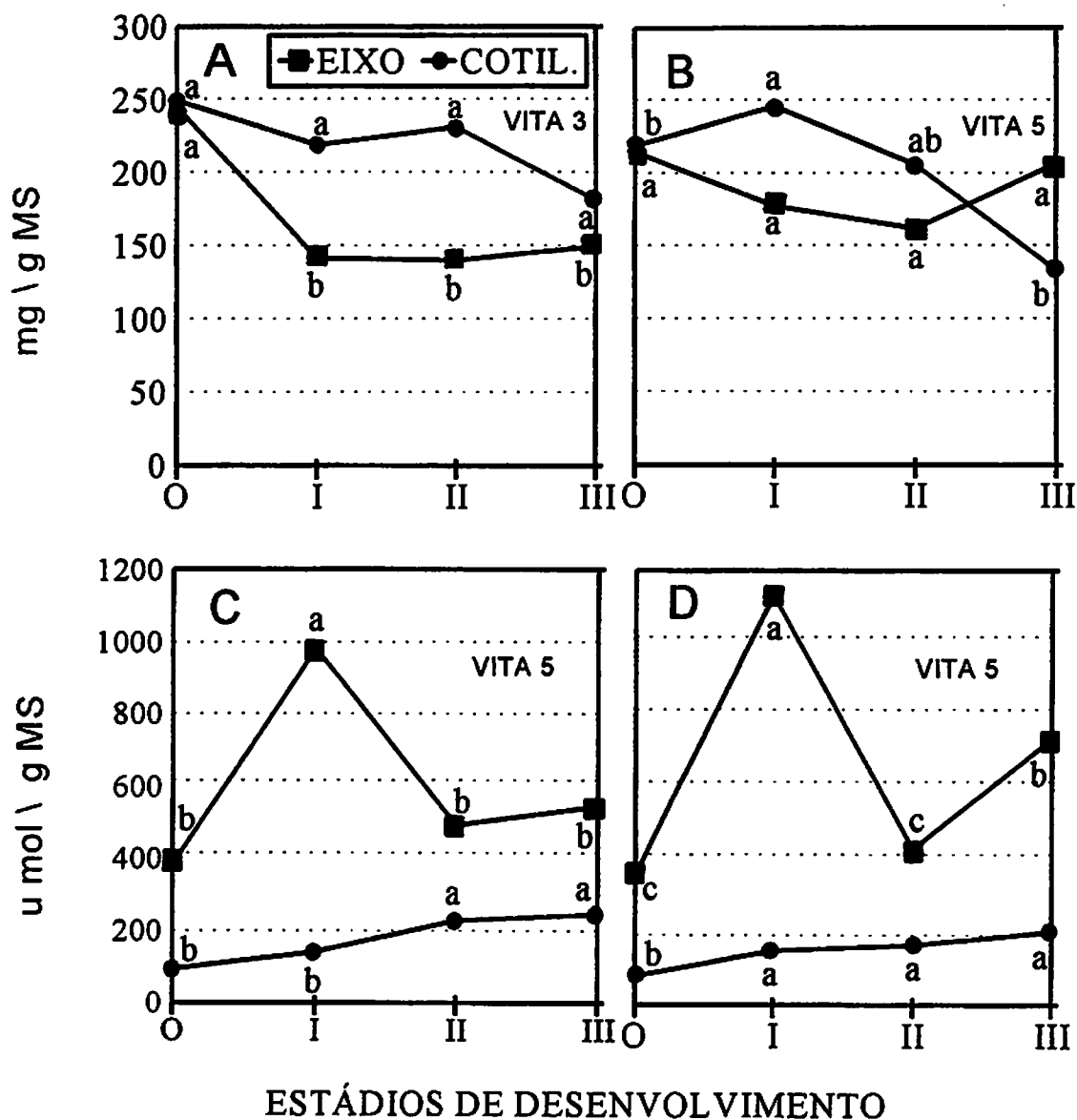


FIGURA 2 - Teores de Proteínas solúveis totais ( A e B ) e de aminoácidos ( C e D ) nos eixos embrionários e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda embebidas em água destilada, nos diversos estádios de desenvolvimento.

Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada órgão, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.2.2 Amido, Açúcares solúveis totais e Açúcares redutores.

Após o período de embebição a que as sementes do estágio 0 foram submetidas, nos eixos embrionários das duas cultivares foram observadas moléculas de amido (Figuras 3A e 3B), resultado da translocação dos produtos da hidrólise do amido que se encontrava armazenado nos cotilédones para os mesmos e de uma nova síntese de amido nesses eixos, como sugerido por Swain e Dekker, citados por Prisco, Eneas Filho e Gomes Filho (1981), uma vez que não existe amido no eixo embrionário de sementes quiescentes (Xavier Filho, 1988). Ao se comparar os teores de carboidratos entre os estádios 0 e I, verificou-se na cultivar “vita 3” uma diminuição do teor de amido apenas no eixo (Figura 3A), sem haver aumento no teor de açúcares solúveis totais (AST) (Figura 3C) e um pequeno aumento no teor de açúcares redutores (Figura 3E), resultado de uma degradação do amido no eixo do estágio I, com grande parte dos produtos de hidrólise possivelmente utilizados na respiração, fato este comprovado pelo não aumento do teor de AST. Esta degradação inicial lenta do amido, está de acordo com Bewley e Black (1994) que diz não existir atividade hidrolítica das substâncias de reservas em cotilédones intactos, antes da emergência da radícula. Quando o estudo foi realizado comparando-se os estádios I e II, concluiu-se que o teor de amido não se modificou no eixo e diminuiu levemente nos cotilédones (Figura 3A), resultado da hidrólise do amido, comprovado pelo aumento do teor de AR nos cotilédones (Figura 3E), ocorrendo ainda translocação de açúcares não redutores para o eixo, onde foram utilizados na respiração, já que o teor de AST permaneceu constante tanto no eixo quanto nos cotilédones (Figura 3C). Resultados bastante semelhantes foram encontrados por Karunagaran e Rao (1991) em sementes de *Macrotyloma uniflorum* (Lam.). As análises dos estádios II e III mostraram que para os teores de amido só foram encontradas modificações nos cotilédones, com

uma leve diminuição (Figura 3A), fato suficiente para elevar o teor de AST no eixo (Figura 3C) e o teor de AR tanto no eixo quanto nos cotilédones (Figura 3E).

Entre os estádios 0 e I, um padrão de translocação dos produtos da degradação do amido semelhante ao da cultivar “vita 3” (Figura 3A) foi encontrado para a cultivar “vita 5” (Figura 3B). No entanto, para essa variedade, os produtos da degradação do amido ficaram armazenados na forma de oligossacarídeos solúveis, visto que os AST aumentaram tanto no eixo quanto nos cotilédones (Figura 3D), diferentemente dos AR que aumentaram apenas no eixo (Figura 3F), sugerindo que até o estágio I, as plântulas dessa cultivar devem apresentar baixas taxas respiratórias. Comparando-se os estádios I e II, pode-se concluir que o teor de amido não se modificou no eixo e diminuiu acentuadamente nos cotilédones (Figura 3B), além de diferentemente da cultivar “vita 3” ocorrer uma diminuição dos açúcares solúveis nos cotilédones (Figura 3D), o que sugere que esta cultivar, entre os estádios mencionados apresentou uma elevação de sua taxa respiratória, correspondendo à passagem da 2ª para a 3ª fase do processo de consumo de O<sub>2</sub> pelas sementes germinando (padrão de respiração de sementes germinando). As análises dos estádios II e III mostraram que os teores de amido nos eixos foram os mesmos, diminuindo um pouco nos cotilédones (Figura 3B), enquanto o teor de AST aumentou tanto no eixo quanto nos cotilédones (Figura 3D), sendo uma parcela desses açúcares na forma de açúcares redutores (Figura 3F). Parte desse aumento nos açúcares solúveis totais pode ser decorrente da incorporação de carbono, já que após o período de embebição das plântulas do estágio III, as mesmas apresentavam suas folhas primárias abertas e enverdecidas, com capacidade de realizar fotossíntese.

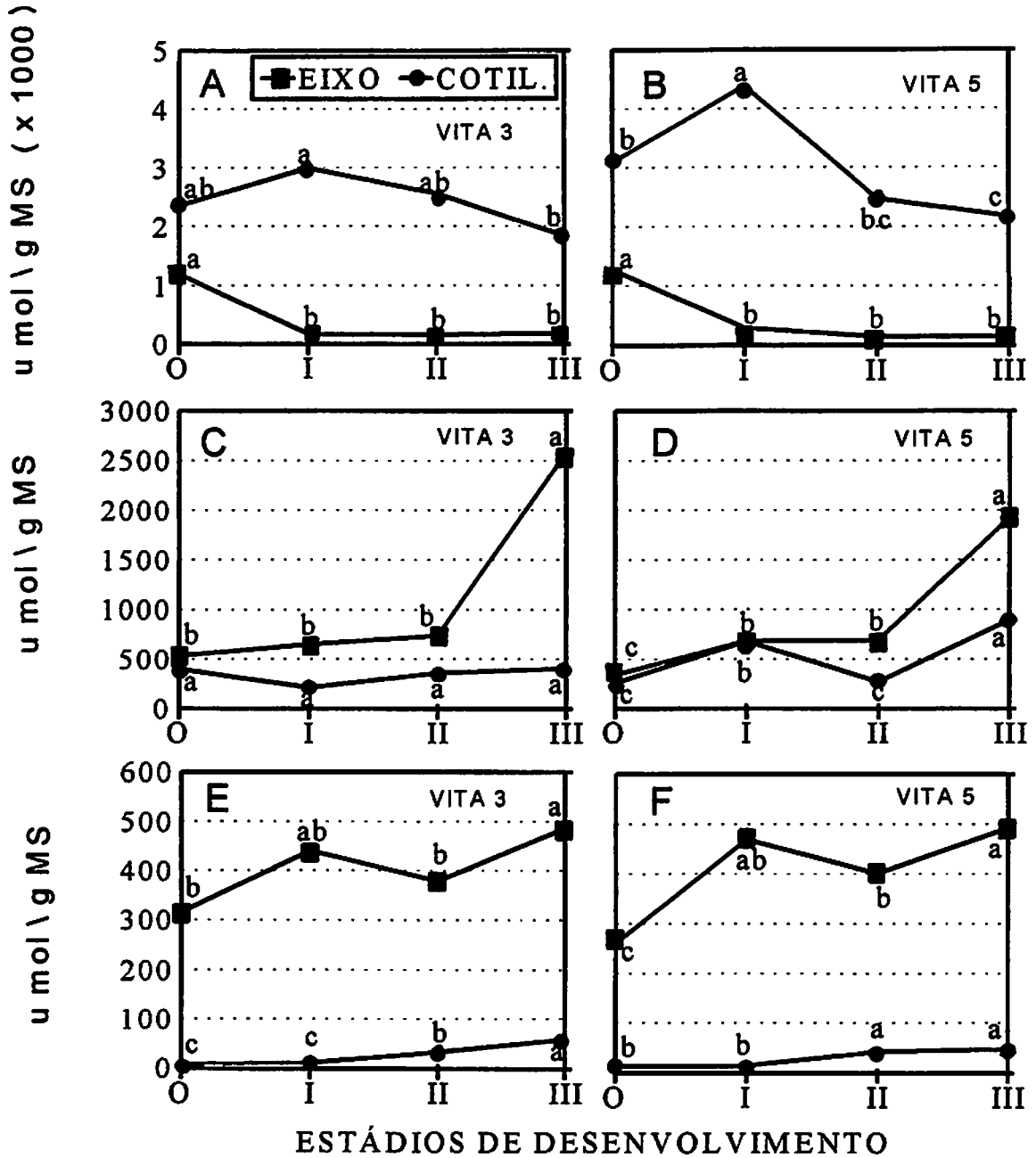


FIGURA 3 - Teores de amido (A e B), açúcares solúveis totais (C e D) e açúcares redutores (E e F) nos eixos embrionários e cotilédones de plântulas de feijão-de-corda embebidas em água destilada, nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada órgão, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No estágio III, as duas cultivares apresentaram altos níveis de amido (Figuras 3A e 3B), o que está de acordo com Monerri, Garcia-Luís e Guardiola (1986) e Juliano e Varner (1969), que trabalhando com sementes de ervilha, encontraram baixa taxa de degradação de amido nos primeiros dias de germinação.

### **4.3 Alterações bioquímicas durante os processos de germinação e estabelecimento inicial das plântulas, submetidas ou não ao déficit hídrico.**

#### **4.3.1 Proteínas e aminoácidos**

No estágio 0, quando se comparou as sementes embebidas em água com as sementes embebidas em solução de PEG 6000 de  $\psi_s = -0,6$  MPa, observou-se para as duas cultivares, uma diminuição do teor de proteínas no eixo embrionário com a aplicação do déficit hídrico (Figuras 4A e 4B), enquanto nos cotilédones não houve alteração (Figuras 4C e 4D). Diminuição na concentração de proteínas nos embriões de sementes de trigo estressadas, foi observado por Dell'aquila (1992), resultante da inibição da síntese de proteínas. Dhindsa e Cleland (1975) trabalhando com aveia, verificaram que o decréscimo do nível de proteínas foi resultado da inibição da síntese e da degradação das proteínas existentes nos tecidos. No presente trabalho, o menor teor de proteínas no eixo das sementes estressadas deveu-se provavelmente ao fato de que as sementes do estágio 0 não absorveram água numa quantidade suficiente para desencadear os processos de síntese e degradação das proteínas. A comprovação pode ser feita pela análise da percentagem de proteínas, que foi de 30,56 e 34,15% para as cultivares "vita 3" e "vita 5", respectivamente, semelhantes aos encontrados em sementes quiescentes por EMBRAPA (1981), Araújo et al (1975) e Chaves et al (1962). Além do mais, a possível degradação das proteínas

levaria a um aumento no nível de aminoácidos, que pelo contrário apresentou diminuição no seu teor, tanto no eixo (Figuras 5A e 5B) quanto nos cotilédones (Figuras 5C e 5D). Essa diminuição poderia ser decorrente da utilização dos mesmos no metabolismo respiratório, responsável pelo desenvolvimento do eixo embrionário. A análise da cultivar “vita 3” mostrou que quando as sementes absorveram água (estádio I), ocorreu uma grande síntese de aminoácidos, que se manteve com o déficit hídrico, demonstrado pelo aumento do teor de aminoácidos tanto no eixo quanto nos cotilédones (Figuras 5A e 5C). Comparando-se os tratamentos, verificou-se que os teores de proteínas e aminoácidos permaneceram inalterados no eixo (Figuras 4A e 5A) e aumentaram nos cotilédones (Figuras 4C e 5C) com a implantação do déficit hídrico, resultados de uma possível inibição da translocação dos produtos da hidrólise das proteínas para o eixo embrionário. Respostas semelhantes foram encontradas em feijão-de-corda cv. seridó submetido a estresse salino ( Prisco e Vieira, 1976 ). O acúmulo de produtos da hidrólise das proteínas nos cotilédones leva a um controle do tipo “feedback”, inibindo a síntese de proteases ( Dunaevsky e Belozersky, 1993 e Davis e Chapman, 1980 ). Analisando o estágio II, encontrou-se que os teores de proteínas (Figuras 4A e 4C) e aminoácidos (Figuras 5A e 5C) permaneceram inalterados, exceto a proteína nos cotilédones que diminuiu com a implantação do déficit hídrico. Os produtos da hidrólise das proteínas foram provavelmente transportados para o eixo embrionário, que é um local de forte e constante demanda de produtos da degradação de substâncias armazenadas nos cotilédones ( Dunaevsky e Belozersky, 1993 e Bewley e Black, 1994 ), e utilizados na formação de moléculas estruturais. No estágio III, o teor de proteínas com o déficit hídrico não foi alterado nos cotilédones (Figura 4C), diminuindo no eixo (Figura 4A), enquanto os teores de aminoácidos diminuíram tanto no eixo quanto nos cotilédones (Figuras 5A e 5C), consequência de uma

provável maior demanda por energia respiratória de manutenção, responsável por manter a integridade celular durante o déficit hídrico ( Hanson e Hitz, 1982 ).

As análises realizadas na cultivar "vita 5", no estágio I mostraram que os teores de proteínas e de aminoácidos tanto no eixo quanto nos cotilédones não foram alterados pelo déficit hídrico (Figuras 4B e 4D e Figuras 5B e 5D respectivamente), fruto possivelmente de um baixo quociente respiratório das sementes. O estágio II apresentou um decréscimo nos níveis de proteínas e aminoácidos no eixo em função do déficit hídrico (Figuras 4B e 5B), enquanto os níveis nos cotilédones não foram afetados (Figuras 4D e 5D). O déficit hídrico nesta fase afetou mais o eixo embrionário, local de ocorrência de crescimento celular, processo que parece ser o mais sensível ao estresse hídrico ( Salisbury e Ross, 1992 ). Comparando-se as cultivares, temos que na cultivar "vita 5" a velocidade de incorporação dos produtos da hidrólise em moléculas estruturais foi maior do que na cultivar "vita 3". Já no estágio III, a análise dos níveis de aminoácidos mostrou não ter ocorrido mudanças quantitativas entre as plântulas estressadas e não estressadas (Figuras 5B e 5D), enquanto o teor de proteínas aumentou nos cotilédones (Figura 4D) e diminuiu nos eixos das plântulas estressadas (Figura 4B). Os resultados sugerem, mais uma vez, a inibição da degradação das proteínas nos cotilédones e a translocação dos produtos da sua hidrólise em virtude do déficit hídrico.

#### **4.3.2 Amido, Açúcares solúveis totais e Açúcares redutores**

Na análise dos hidratos de carbono no estágio 0 da cultivar "vita 3", observou-se que o déficit hídrico diminuiu o teor de amido no eixo (Figura 6A) e não alterou-o nos cotilédones

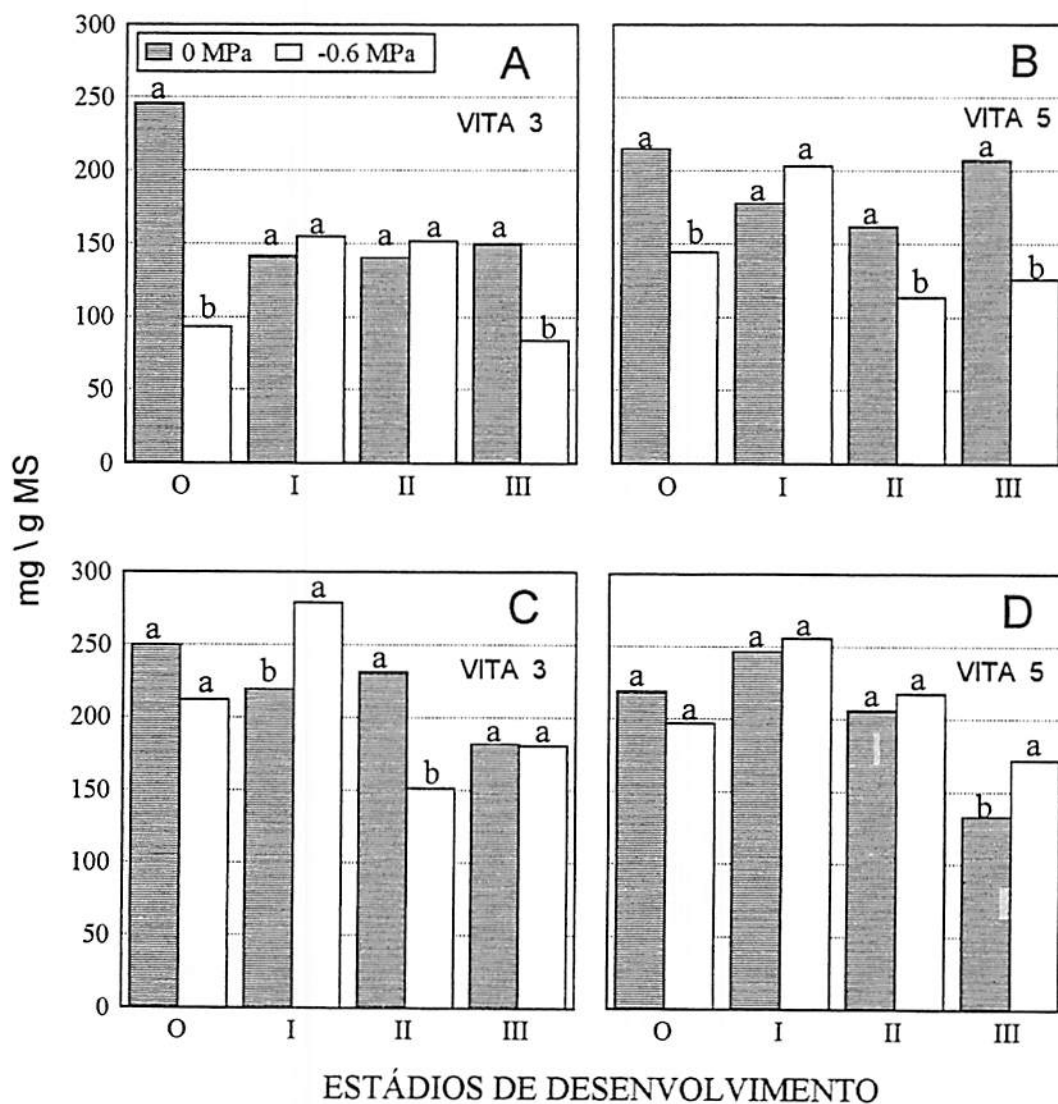


FIGURA 4 - Teores de proteínas solúveis totais nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estágio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



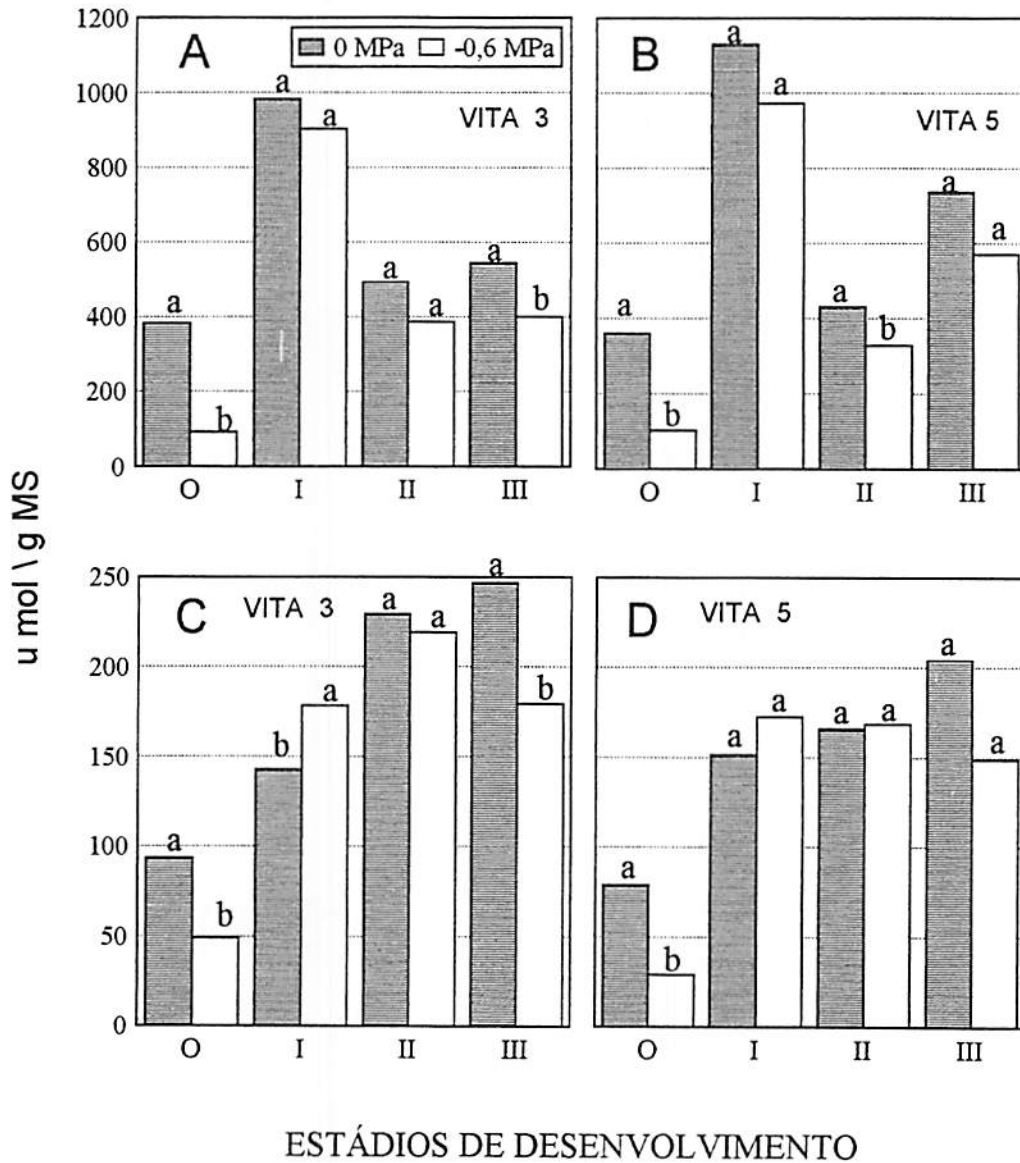


FIGURA 5 - Teores de aminoácidos nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estágio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

(Figura 6C). A mobilização dos produtos da hidrólise do amido para o eixo embrionário teve início nas primeiras horas de embebição (Xavier Filho, 1988), como pode ser observado pelo alto teor de amido no eixo das sementes mantidas em condições normais. Os produtos da hidrólise do amido nos cotilédones foram translocados para o eixo, comprovado pelo aumento no teor de AST no eixo (Figura 7A). Entretanto, a inibição de uma nova síntese de amido no eixo não foi acentuada, uma vez que o teor de amido total (57,55% do peso da matéria seca) está bem próximo do encontrado em sementes quiescentes (EMBRAPA, 1981, Araújo et al, 1975 e Chaves et al, 1962). Nos cotilédones, o teor de AST permaneceu inalterado (Figura 7C), enquanto os AR diminuíram tanto no eixo quanto nos cotilédones (Figuras 8A e 8C). As sementes após serem embebidas (estádio I) e submetidas ao déficit hídrico, tiveram um aumento na degradação do amido nos cotilédones (Figura 6C), elevando o teor de AST tanto nos cotilédones (Figura 7C) quanto no eixo (Figura 7A), o que pode ter provocado a inibição da degradação do amido no eixo. Notou-se ainda uma diminuição do teor de AR nos cotilédones (Figura 8C), reforçando a sugestão de que a maior parte dos monossacarídeos foram transportados para o eixo (Figura 8A), ficando nos cotilédones oligo e dissacarídeos, especialmente sacarose. Koster e Leopold (1988) também observaram uma grande concentração de açúcares (sacarose, rafinose e estachiose) no eixo embrionário de sementes de ervilha que se encontravam nos primeiros estádios de germinação. Na análise do estágio II encontrou-se um aumento dos teores de amido, AST e AR no eixo (Figuras 6A, 7A e 8A) e uma diminuição dos teores de amido e AR nos cotilédones (Figuras 6C e 8C), com os AST mantendo-se quantitativamente igual (Figura 7C). Os resultados mostraram-se semelhantes aos obtidos no estágio anterior, com uma diferença apenas no metabolismo respiratório das plântulas estressadas, que no estágio II parece ter sido mais acentuado, evidenciado pela diminuição do teor de amido no eixo e do teor de AST no eixo e nos

cotilédones, mostrando a existência de um grande gasto de energia metabólica para a manutenção e para o crescimento do embrião. Por último, o estágio III mostrou no eixo embrionário, uma diminuição nos teores de amido (Figura 6A), AST (Figura 7A) e AR (Figura 8A) com a implantação do déficit hídrico, diferentemente dos cotilédones que mostraram um decréscimo apenas no teor de amido (Figura 6C). Nesse estágio, ocorreu uma maior degradação do amido e dos açúcares solúveis nas plântulas estressadas, semelhante ao encontrado no metabolismo das reservas protéicas, consequência de uma provável maior demanda por energia respiratória, necessário para a manutenção das células vivas e em crescimento ( Hanson e Hitz, 1982 ).

A cultivar “vita 5” exibiu no estágio 0 um padrão de utilização dos carboidratos semelhante ao apresentado pela cultivar “vita 3”, diferindo apenas quanto ao teor de AST nos cotilédones, que aqui foi aumentado (Figura 7D), indicando existir uma maior degradação do amido nos cotilédones (Figura 6D). No estágio I, onde ainda existia grande quantidade de amido, o teor do mesmo não foi alterado no eixo (Figura 6B), diminuindo nos cotilédones, fruto de uma maior degradação em função do déficit hídrico (Figura 6D), elevando o teor de AST no eixo (Figura 7B), fato observado em ervilha por Koster e Leopold (1988). No entanto, o teor de AST nos cotilédones diminuiu, juntamente com o teor de AR (Figuras 7D e 8D), mostrando que os produtos da degradação do amido são predominantemente carregados para o eixo embrionário em crescimento ( Ziegler, 1995 ). O estágio II apresentou um acréscimo no nível de amido no eixo (Figura 6B) e um decréscimo nos cotilédones (Figura 6D). Quando se observou os açúcares solúveis, constatou-se que o nível de AST no eixo aumentou (Figura 7B) e não foi alterado nos cotilédones em função do déficit hídrico (Figura 7D). Nesse estágio, as sementes já apresentavam protrusão da radícula e o eixo se encontrava em pleno desenvolvimento, fazendo com que as plântulas estressadas aumentasse o transporte das substâncias osmoticamente ativas para as

regiões de crescimento. O nível de AR diminui no eixo e nos cotilédones (Figuras 8B e 8D) em função do déficit hídrico. Já para o estágio III, quando se analisou os teores de carboidratos, observou-se que o déficit hídrico não afetou-os fortemente, uma vez que os teores de amido (Figuras 6B e 6D) e de AR (Figuras 8B e 84D) não foram afetados, ocorrendo mudanças apenas nos teores de AST, com aumento no eixo (Figura 7B) e decréscimo nos cotilédones (Figura 7D). Os resultados mais uma vez sugerem ter ocorrido um transporte de substâncias osmoticamente ativas para o órgão em crescimento. Comparando-se os estádios de desenvolvimento II e III, notou-se um grande aumento dos AST tanto no eixo quanto nos cotilédones, levando à suposição de que parte desse aumento possa ser em decorrência da incorporação de carbono atmosférico.

#### **4.4 Alterações físicas e bioquímicas decorrentes da implantação do déficit hídrico nas variedades estudadas**

##### **4.4.1 Teores de macro e micromoléculas**

Com relação aos teores de suas macro e micromoléculas, observou-se que as duas cultivares apresentaram resultados bastante semelhantes entre os teores de açúcares solúveis totais e de aminoácidos, solutos que se acumulam durante o estresse hídrico, reduzindo o potencial osmótico da célula (Bray, 1993 e Hanson e Hitz, 1982), nos diversos estádios de desenvolvimento de plântulas estressadas e não estressadas. No entanto, algumas diferenças foram observadas. No estágio 0, o déficit hídrico induziu uma maior degradação de amido nos cotilédones da cultivar “vita 5” (Figura 6D), com um conseqüente aumento no teor de AST nos

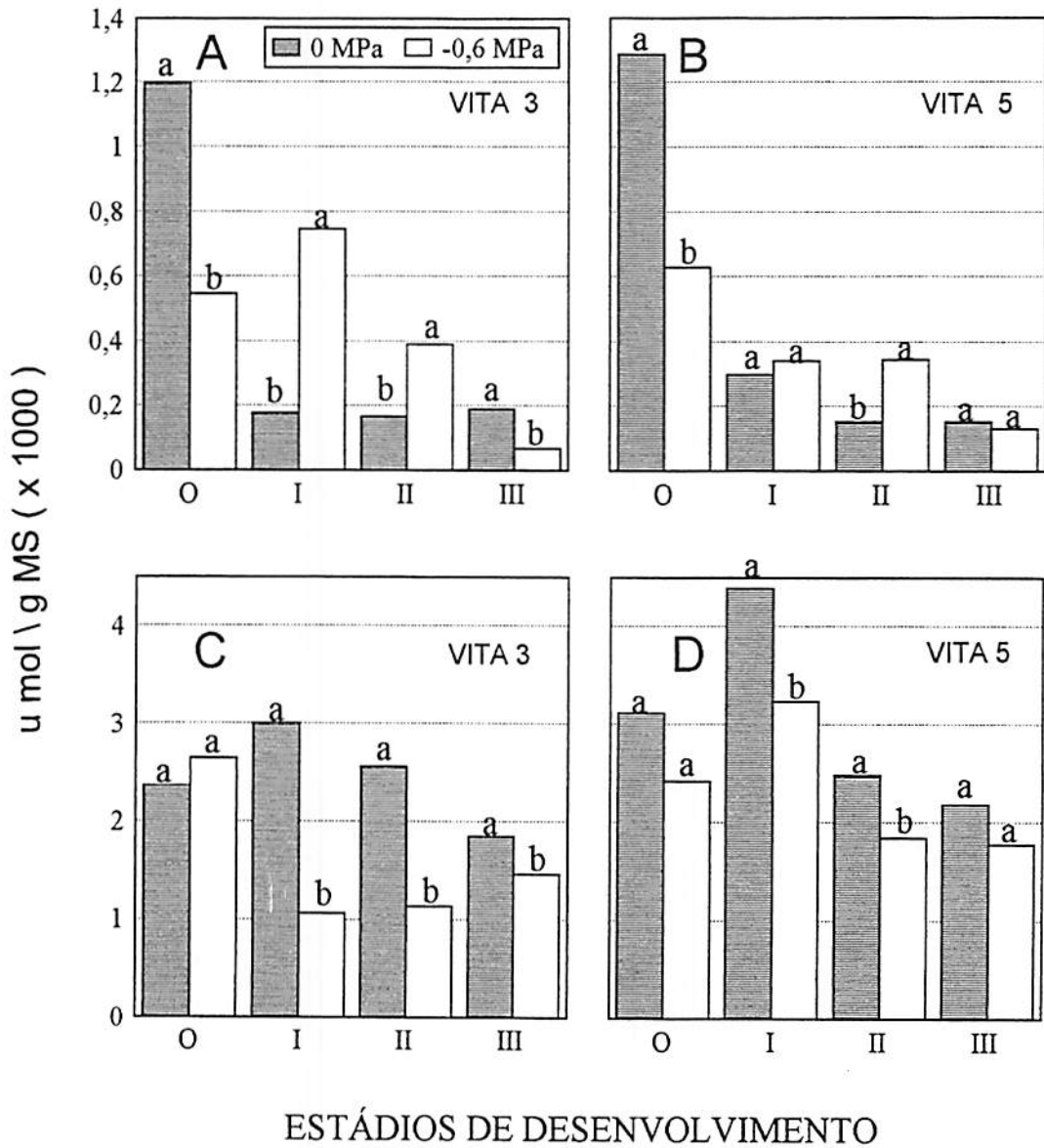


FIGURA 6 - Teores de amido nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estágio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

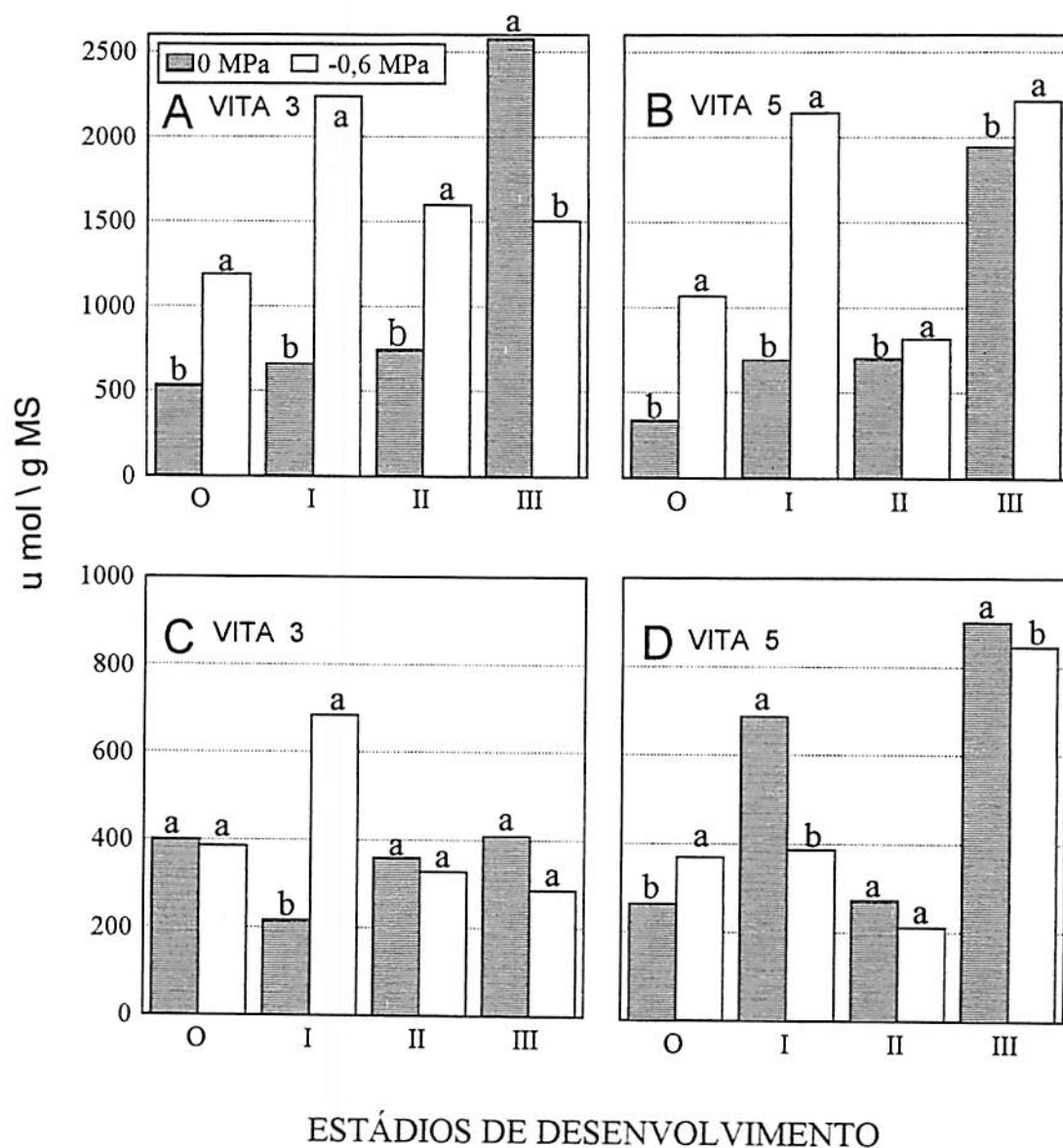


FIGURA 7 - Teores de açúcares solúveis totais nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estádio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

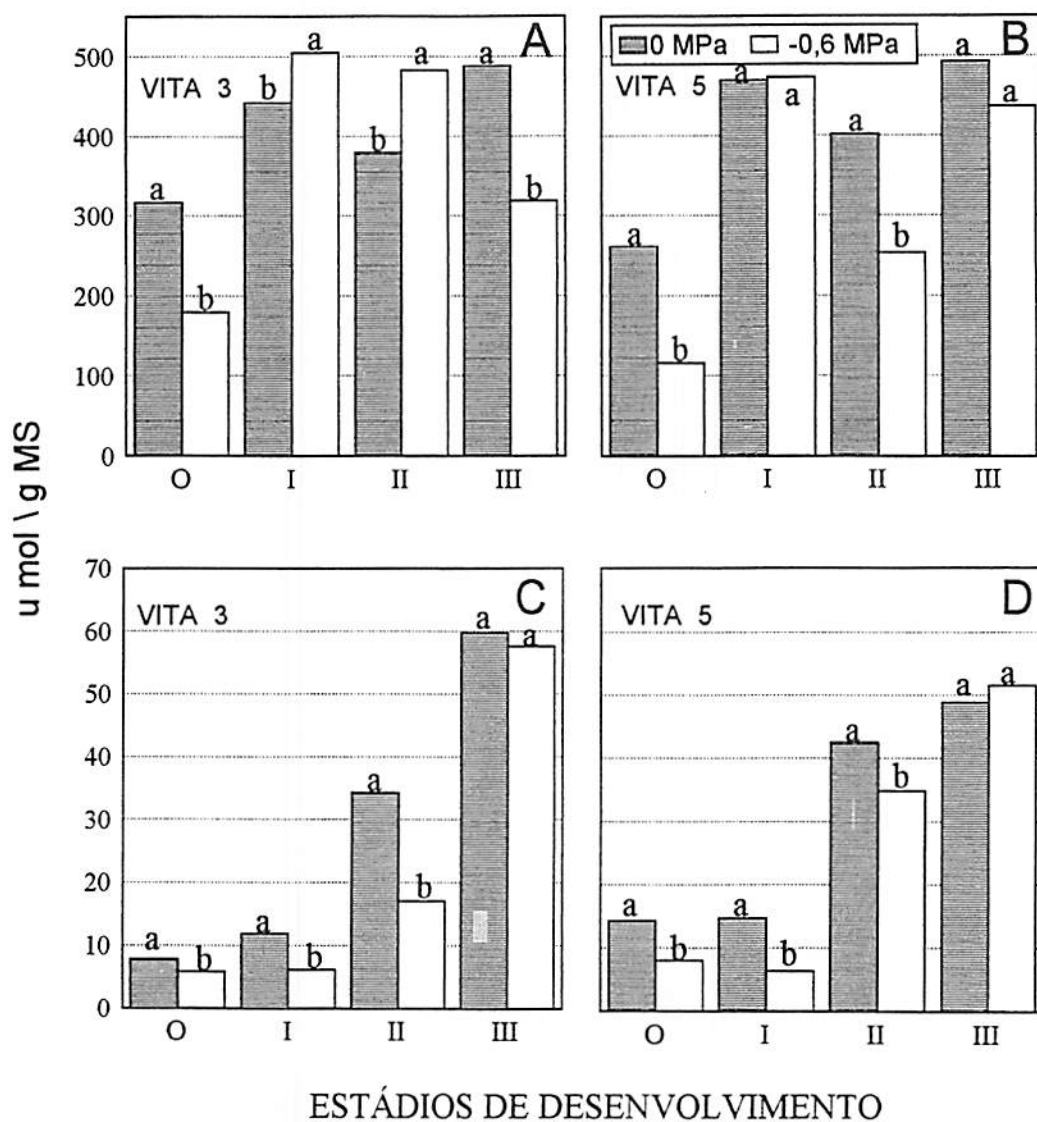


FIGURA 8 - Teores de açúcares redutores nos eixos embrionários ( A e B ) e cotilédones ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estádio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

cotilédones (Figura 7D), fato não observado na cultivar “vita 3” (Figura 7C). Quando se analisou o estágio I, observou-se que a implantação do déficit hídrico levou a um aumento no nível de aminoácidos e de AST nos cotilédones da cultivar “vita 3” (Figuras 5C e 7C), provavelmente devido a uma redução no processo de translocação dessas moléculas para o eixo embrionário. Um aumento no nível dessas moléculas não foi observado para a cultivar “vita 5”, que contrariamente teve o teor de AST diminuído nos cotilédones (Figura 7D). No estágio II, a cultivar “vita 5” apresentou um decréscimo no nível de AST no eixo embrionário (Figura 7B), enquanto a cultivar “vita 3” manteve o seu teor estável (Figura 7A). Os resultados sugerem que durante os três primeiros estádios de desenvolvimento, a cultivar “vita 3” diminuiu seu metabolismo em resposta ao déficit hídrico. Já no estágio III, a cultivar “vita 5” manteve estável os seus teores de aminoácidos no eixo e nos cotilédones (Figuras 5B e 5D), enquanto na cultivar “vita 3” o teor de aminoácidos diminuiu tanto no eixo quanto nos cotilédones (Figuras 5A e 5C). Estes resultados indicam que possivelmente ocorreu uma aceleração do metabolismo respiratório das plântulas estressadas da cultivar “vita 3”, nesse estágio de desenvolvimento. As poucas diferenças existentes entre as cultivares, em resposta ao déficit hídrico, provavelmente se deva ao fato de que nos quatro primeiro estádios de desenvolvimento do feijão-de-corda, as plântulas ainda apresentavam seus cotilédones fechados e, conseqüentemente, a demanda por energia metabólica para o crescimento do eixo embrionário ainda era baixa. Aliado a isso, segundo Taiz e Zeiger (1991), o feijão-de-corda não apresenta ajustamento osmótico.



#### **4.4.2 Teores da fração rica em proteínas “LEA”**

As proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), grupos de proteínas que são predominantemente formadas durante as fases de maturação e dessecação da semente, podendo ainda serem formadas em tecidos vegetativos submetidos a estresses ( Bray, 1993 ), têm sido correlacionadas com a tolerância à baixa disponibilidade de água ( Blackman, Obendorf e Leopold, 1992 ).

Nesse sentido, procedeu-se análises na fração protéica rica em proteínas LEA, sendo encontrado que a razão entre o teor da fração rica em proteínas LEA e o teor de proteínas solúveis totais nos eixos embrionários das plântulas submetidas ao déficit hídrico, aumentou apenas no estágio II das plântulas da cultivar “vita 3” (Figura 9A), enquanto na cultivar “vita 5” o aumento só não foi observado no estágio I (Figura 9B). O fato da cultivar “vita 3” apresentar aumento no teor dessas proteínas apenas no estágio II das plântulas estressadas, sugere que a mesma já apresentava o nível máximo dessas proteínas nas sementes e plântulas dos demais estádios mantidas sob condições normais.

Entretanto, torna-se imperativo a continuidade de pesquisas sobre as proteínas LEA em feijão-de-corda, a fim de que se possa encontrar respostas mais conclusivas sobre a eficiência dessas proteínas na proteção aos efeitos deletérios do déficit hídrico na espécie mencionada.

#### **4.4.3 Perdas eletrolíticas**

Ao se observar o efeito do déficit hídrico na integridade das membranas celulares dos eixos embrionários, foi encontrado nas duas cultivares, um aumento na taxa de perdas eletrolíticas

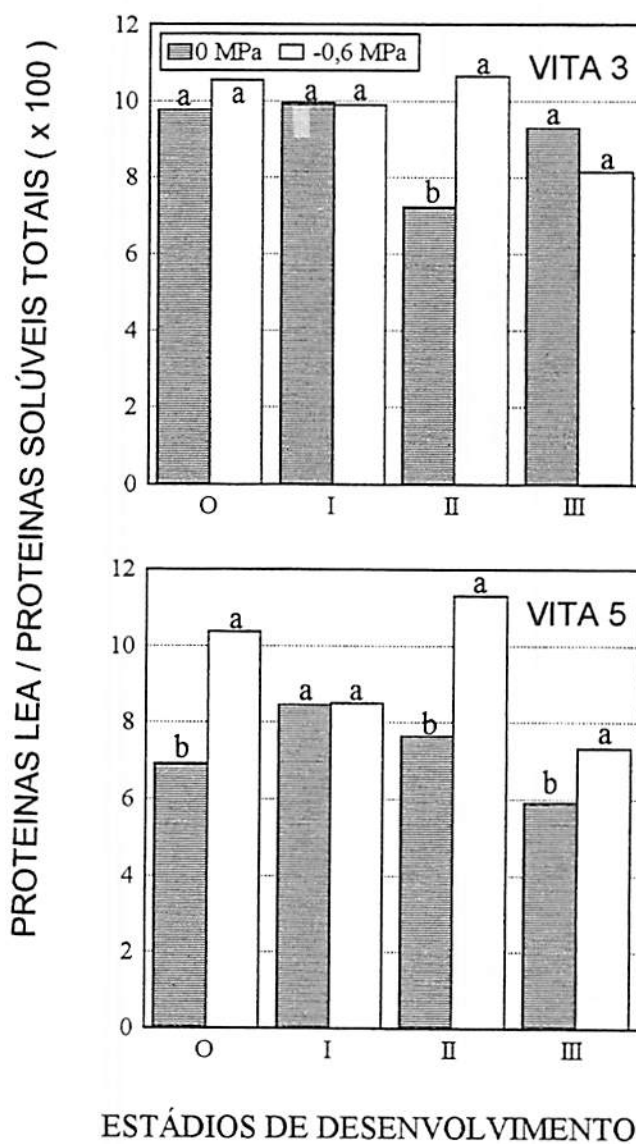


FIGURA 9 - Teor de proteínas LEA em relação ao teor de proteínas solúveis totais nos eixos de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estágio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

das sementes do estágio 0, com um aumento mais acentuado na cultivar “vita 5” ( $K_2 = 0,534$  e  $0,624 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para as cultivares “vita 3” e “vita 5” respectivamente) enquanto as plântulas dos demais estádios não foram afetadas (Figura 10A e 10B). Contrariamente ao encontrado por Koster e Leopold (1988), as sementes do estágio 0 submetidas ao déficit hídrico apresentaram alta taxa de perdas eletrolíticas, o que pode se explicar pelo fato de que as sementes quiescentes apresentavam as suas estruturas membranares desorganizadas, havendo uma reorganização com a embebição de água, processo não apresentado nas sementes submetidas ao déficit hídrico, que não absorveram água suficiente para o reparo e reconstrução das estruturas das membranas. Altas taxas de perdas também foram encontradas em sementes de soja por Blackman, Obendorf e Leopold (1995). Para os demais estádios de desenvolvimento analisados, supõe-se ter ocorrido uma preservação estrutural das membranas celulares das sementes e plântulas estressadas, resultado da ação das proteínas do Grupo 4 das LEA (família D-113) (Bray, 1993). Evidências nesse sentido parecem serem suportadas pela observação de altos teores da fração rica em proteínas LEA (média em torno de 9,5% das PST) nas duas variedades estudadas, bem superiores aos teores de outras espécies, como soja (média de 4,5% das PST) (Blackman, Obendorf e Leopold, 1995). No entanto, respostas mais concretas quanto à ação protetora das proteínas LEA na integridade das membranas, só serão alcançadas se submetermos sementes colhidas em vários estádios de maturação, à germinação sob condições de déficit hídrico. Nessas condições, parte das sementes supostamente não conteriam as proteínas LEA, visto que as mesmas são formadas nos últimos estádios de maturação e, presumivelmente apresentariam maiores perdas eletrolíticas.

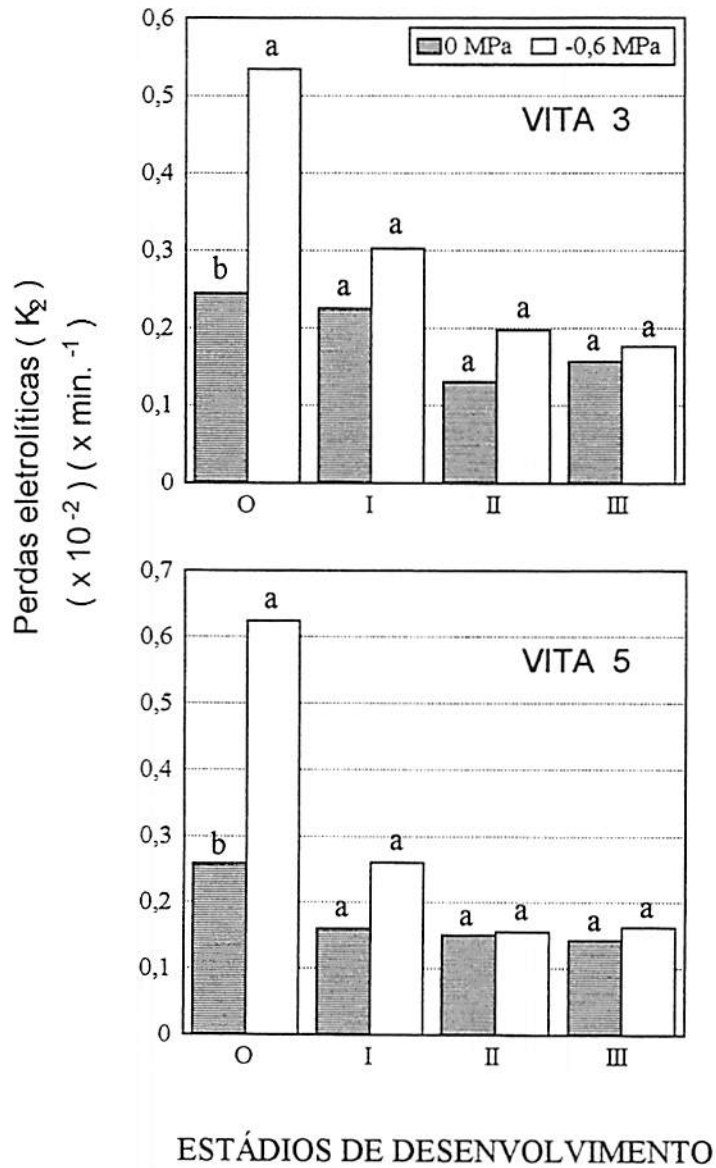



FIGURA 10 - Perdas eletrolíticas (  $K_2$  ) nos eixos de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estágio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.4.4 Vigor das plântulas

Quando as sementes e plântulas estressadas retornaram às condições normais de hidratação e permaneceram nessas condições por sete dias, verificou-se que o déficit hídrico reduziu a matéria seca das raízes no estágio 0 das duas cultivares e no estágio III da cultivar “vita 5”, enquanto nos demais estádios houve a recuperação do peso com a retomada da embebição (Figuras 11A e 11B). No entanto, o comprimento das raízes principais estressadas da cultivar “vita 3” foi menor que as raízes principais não estressadas, nos três primeiros estádios de desenvolvimento (Figura 12A), sugerindo que sob déficit hídrico, produziu-se uma maior quantidade de raízes secundárias nos estádios I e II dessa cultivar. Na cultivar “vita 5”, apenas o estágio 0 apresentou decréscimo no comprimento das raízes principais, com a implantação do déficit hídrico (Figura 12B). Por outro lado, a cultivar “vita 3” apresentou acréscimo na matéria seca da parte aérea, incluindo os cotilédones, nos estádios 0, I e II após o déficit hídrico (Figura 11C), contrariamente à cultivar “vita 5” que não apresentou diferenças entre plântulas estressadas e não estressadas, sugerindo a ocorrência da utilização das reservas cotiledonárias em ambos os tratamentos (Figura 11D). Como o desenvolvimento das raízes sob baixo potencial osmótico do substrato é considerado um mecanismo de adaptação a condições de estresse hídrico ( Wu et al, 1994 ), é possível sugerir que nos primeiros estádios de desenvolvimento a cultivar “vita 3” foi mais hábil em retomar sua taxa de crescimento normal, uma vez que manteve-se a mesma quantidade de matéria seca e não houve a utilização das reservas nas plântulas estressadas. O comprimento da parte aérea das duas cultivares foi diminuído em todos os estádios com o estabelecimento do déficit hídrico (Figuras 12C e 12D). É sabido que o crescimento da parte aérea é mais prejudicado e/ou inibido que o alongamento das raízes nas plantas submetidas a déficit



hídrico ( Wu et al, 1994 ). Bensen, Boyer e Mullet (1988) sugerem que essa inibição é decorrente da redução da extensibilidade da parede celular e/ou decréscimo no potencial de pressão. Sugerem ainda que em hipocótilos de soja esse decréscimo do crescimento é sempre acompanhado por um aumento no nível de ABA na zona de alongamento.

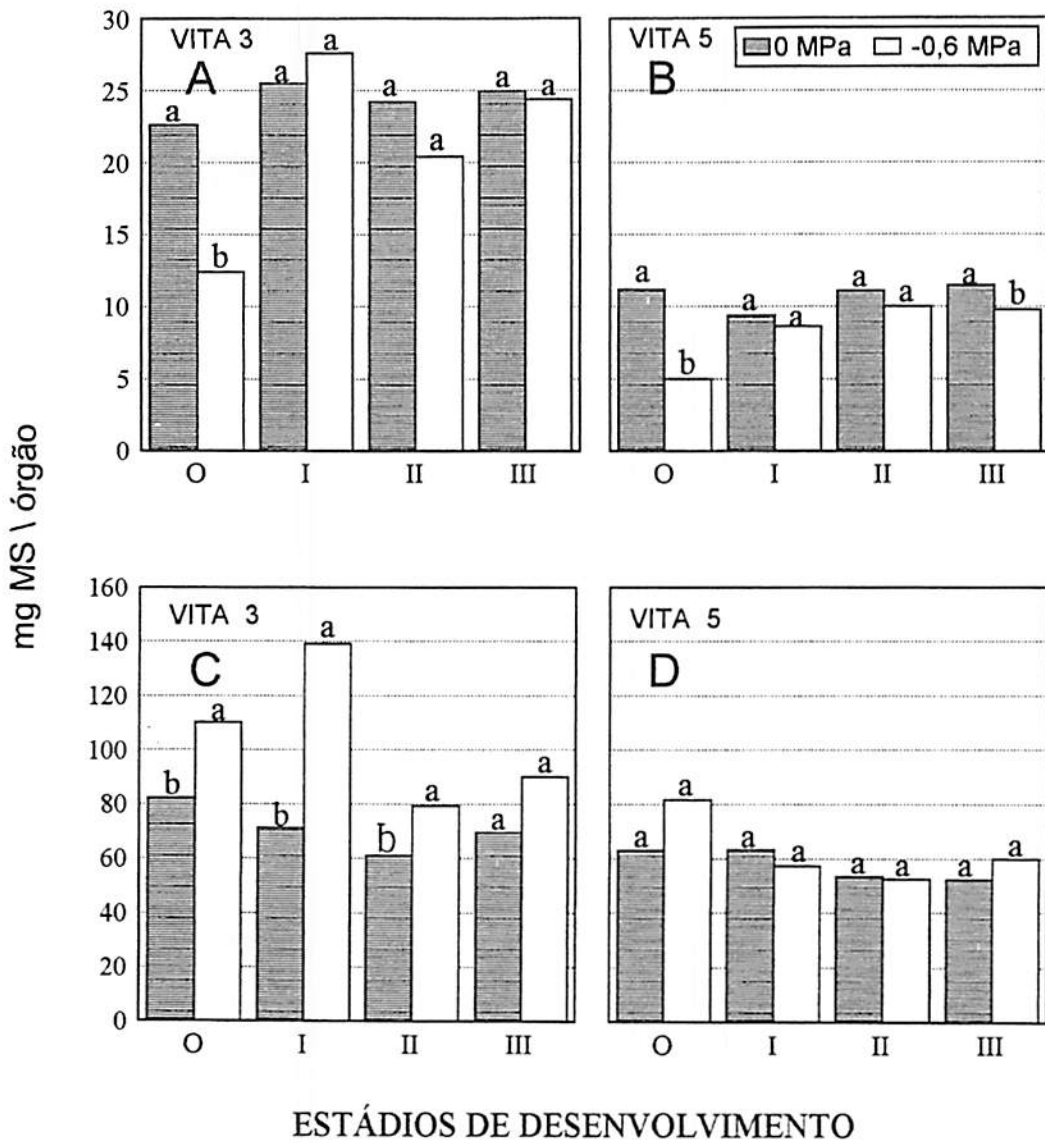


FIGURA 11 - Peso da matéria seca nas raizes ( A e B ) e parte aérea ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estádio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

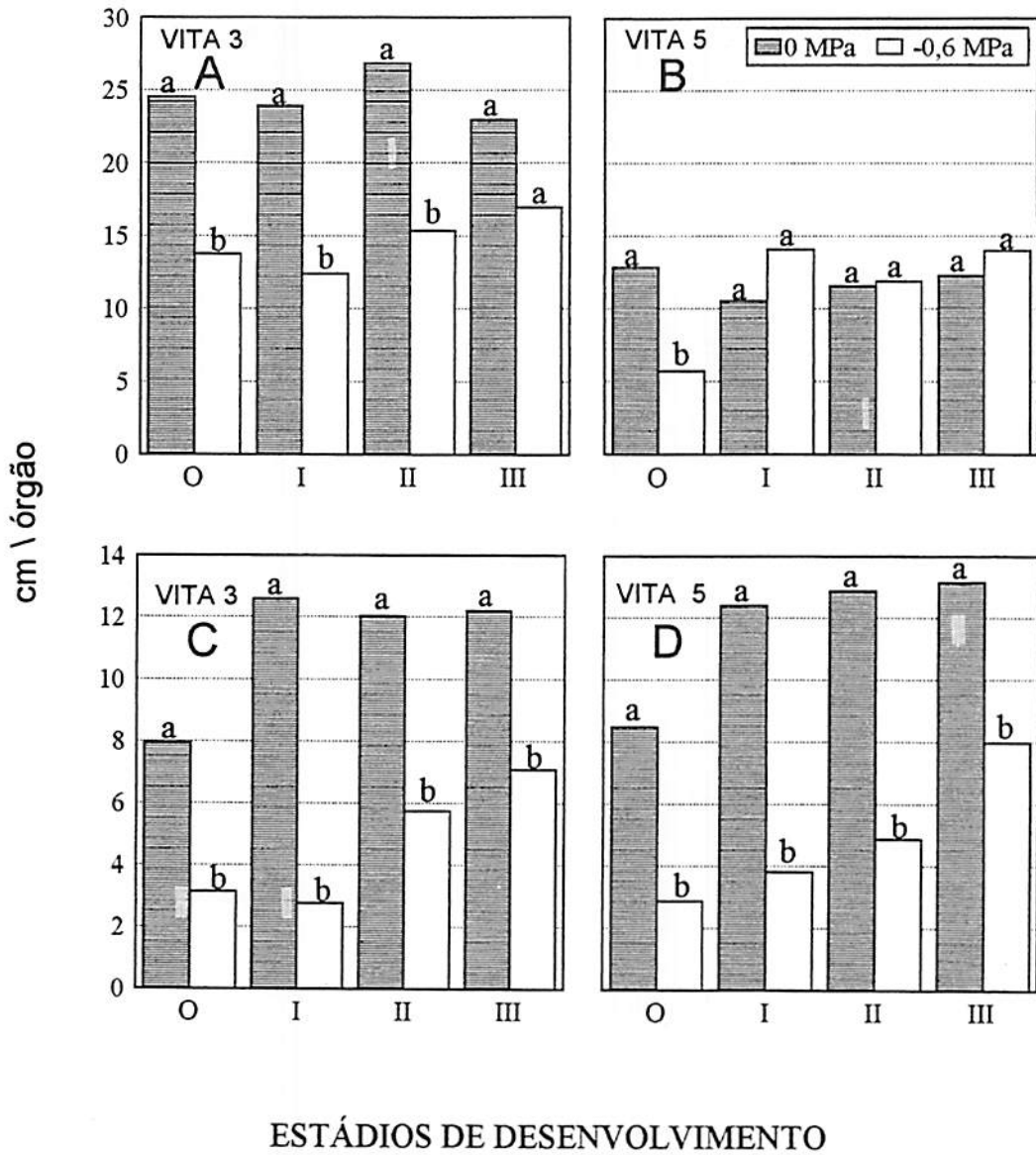


FIGURA 12 - Comprimento (cm) das raízes ( A e B ) e parte aérea ( C e D ) de plântulas de feijão-de-corda nos diversos estádios de desenvolvimento. Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada estágio de desenvolvimento, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



## **5 CONCLUSÕES**

Foram observados os seguintes estádios de desenvolvimento durante a germinação e o estabelecimento das plântulas: 0 (zero) - sementes quiescentes; I - sementes intumescidas; II - sementes com radículas até 2,0 cm; III - plântulas emergindo do solo; IV - plântulas com hipocótilos na forma de gancho, na horizontal ou na vertical; V - plântulas com folhas fora dos cotilédones, ainda enroladas, na vertical ou inclinadas; VI - plântulas com folhas não abertas e na horizontal; VII - plântulas com folhas abertas e na horizontal.

O teor de proteínas diminuiu ao longo dos quatro primeiros estádios de desenvolvimento, fato observado nos cotilédones das duas cultivares germinadas sob condições hídricas normais.

Os teores de aminoácidos nos eixos embrionários das duas cultivares embebidas em água, mostrou até o estágio I um aumento, seguido de um decréscimo nos três estádios de desenvolvimento seguintes.

As sementes e plântulas mantidas sob condições normais apresentaram um decréscimo no teor de amido nos cotilédones, acompanhado de um aumento nos açúcares solúveis totais e nos açúcares redutores nos eixos embrionários dos estádios de desenvolvimento analisados.

Nas sementes e plântulas estressadas, os teores de proteínas nos cotilédones aumentaram do estágio 0 para o estágio I, diminuindo progressivamente com o desenvolvimento das plântulas.

De maneira geral, o déficit hídrico afetou os teores de açúcares nos eixos embrionários das plântulas nos quatro estádios de desenvolvimento, enquanto os teores de proteínas e aminoácidos não foram afetados somente no eixo embrionário de sementes no estágio I.

Apesar das poucas diferenças existente entre as cultivares, decorrente da baixa demanda por energia metabólica, resultante do pequeno crescimento do eixo embrionário das plântulas nos estádios analisados, quando mantidas sob déficit hídrico a cultivar “vita 5” apresentou um padrão de hidrólise e utilização das reservas mais intenso nos três primeiros estádios de desenvolvimento, apresentando ainda um aumento mais acentuado da fração protéica rica em proteínas LEA.

Não se observou perdas eletrolíticas em função do déficit hídrico nas duas cultivares.

Com relação ao crescimento das plântulas, o déficit hídrico prejudicou mais a parte aérea do que o sistema radicular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUZ, I.L.; BENEVIDES, N.M.B. Partial purification of BAPA-ase from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Biologia Plantarum**, Vodickova, v.24, p.39-47, 1982.
- AINOUZ, I.L.; BENEVIDES, N.M.B.; FREITAS, A.L.P. Proteolytic activities in seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Biologia Plantarum**, Vodickova, v.23, p.133-140, 1981.
- ALLEN, R.D.; ARNOTT, H.J.; NESSLER, C.L. Effects of embryonic axis and exogenous growth regulators on sunflower cotyledon storage protein mobilization. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.62, n.3, p.375-383, Nov. 1984.
- ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Orgs.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. 722p.
- ARAÚJO, T.M.V.C.; LAGO, E.S.; BION, F.M.; NASCIMENTO, J.S.; COSTA, L.P.; ANTUNES, N.L.M.; CHAVES, N.; MELO, A.V. Valor nutritivo das misturas: feijão macaçar integral + farinha de mandioca, e feijão mulatinho integral + farinhas de mandioca, suplementada com diferentes níveis de metionina. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas Biológicas**, São Paulo, v.8, p.143-147, 1975.
- ASHTON, F.M. Mobilization of storage protein of seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.27, p.95-117, 1976.
- BAKER, J.; STEELE, C.; DURE, L. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v.11, p.277-291, 1988.
- BENSEN, R.J.; BOYER, J.S.; MULLET, J.E. Water deficit-induced changes in abscisic acid, growth, polysomes, and translatable RNA in soybean hypocotyls. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, n.2, p.289-294, Oct. 1988.
- BERGARECHE, C.; AYUSO, R.; MASGRAU, C.; SIMON, E. Nitrate reductase in cotyledons of cucumber seedlings as affected by nitrate, phytochrome and calcium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n. 2, p.257-262, June 1994.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.93, n.4, p.630-638, Apr. 1995.
- BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology*, Rockville, v.100, n.1, p.225-230, Sept. 1992.
- BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiology*, Rockville, v.96, n. 3, p.868-874, July 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- BRADFORD, K.J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 1995. p.351-396.
- BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, Rockville, v.103, n. 4, p.1035-1040, Dec. 1993.
- CALLIS, J. Regulation of protein degradation. *The Plant Cell*, Rockville, v.7, n. 7, p.845-857, July 1995.
- CHAVES, N.; BARROS, M.M.R.; MADRUGA, I.; LAPA, M.A.G.; FREITAS, C.P.; LIMA, J.A.L.; COSTA, L.P. Valor nutritivo da associação de proteínas do feijão macaçar (*Vigna sinensis*) e de castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Revista Brasileira de Medicina*, São Paulo, v. 19, n. 7, p.385-395, jul. 1962.
- CHRISPEELS, M.J.; BAUMGARTNER, B.; HARRIS, N. Regulation of reserve protein metabolism in the cotyledons of mung bean seedlings. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, Washington, v.73, p.3168-3172, 1976.
- COCKING, E.C.; YEMM, E.W. Estimation of amino acids by ninhidrin. *The Biochemical Journal*, London, v.58, n.1, p.12-13, Jan. 1954.
- COSGROVE, D.J. Analysis of the dynamic and steady-state responses of growth rate and turgor pressure to changes in cell parameters. *Plant Physiology*, Rockville, v.68, n. 6, p.1439-1446, Dec. 1981.
- DALE, J.E. Gibberellins and early growth in seedlings of *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, New York, v.89, p.155-164, 1969.
- DAVIES, H.V.; CHAPMAN, J.M. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. *Planta*, New York, v.149, n. 2, p.288-291, July 1980.

- DELL'AQUILA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol. **Annals of Botany**, London, v.69, n. 2, p.167-171, Feb. 1992.
- DHINDSA, R.S.; CLELAND, R.E. Water stress and protein synthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v.55, n. 4, p.778-781, Apr. 1975.
- DUNAEVSKY, Y.E.; BELOZERSKY, M.A. Effects of the embryonic axis and phytohormones on proteolysis of the storage protein in buckwheat seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.88, p.60-64, 1993.
- EARNSHAW, M.J. Stress indicators: electrolyte leakage. In: HENDRY, G.A.F.; GRIME, J.P. (eds.). **Methods in comparative plant ecology: a laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p.152-154.
- EMBRAPA. Departamento Técnico-científico. **Programa Nacional de Pesquisa de Feijão**. Brasília, 1981. 117p.
- ESPELUND, M.; BEDOUT, J.A. de.; OUTLAW JUNIOR, W.H.; JAKOBSEN, K.S. Environmental and hormonal regulation of barley late-embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs is via different signal transduction pathways. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.18, n. 8, p.943-949, Aug. 1995.
- FERREIRA, A.G.; DIETRICH, S.M.C.; HANDRO, W. Changes in the metabolism of *Araucaria angustifolia* during the early phases of germination and growth. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.2, n.1, p.67-71, ago. 1979.
- GEPSTAIN, S.; ILAN, I. A promotive action of kinetin on amylase activity in cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Cell and Physiology**, Kyoto, v.11, p.819-822, 1970.
- GUAZZELLI, R.J. Histórico das pesquisas com caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (orgs.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. cap. 2, p. 49-59.
- GUERRERO, F.D.; JONES, J.T.; MULLET, J.E. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v.15, p.11-16, 1990.
- GUIMARÃES, C.M.; WATT, E.E.; ARAÚJO, J.P.P. de. Avaliação de germoplasma do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) para resistência à seca. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 1, Goiania, 1982. **Resumos**. Goiania: EMBRAPA-CNPAP, 1982. P.228-235.
- HANSON, A.D.; HITZ, W.D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.33, p.163-203, 1982.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

RECEIVED  
MAY 15 1964

TO THE DIRECTOR  
FROM THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

RE: [Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

- HARRIS, N.; CHRISPEELS, M.J.; BOULTER, D. Biochemical and histochemical studies on protease activity and reserve protein metabolism in the cotyledons of germinating cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Journal of Experimental Botany**, London, v.26, n.93, p.544-554, Aug. 1975.
- HARRIS, M.; SMITH, D.L.; MACKENDER, R.O. Growth analysis of soybean seedlings during the lifespan of the cotyledons. **Annals of Botany**, London, v.57, p.69-79, 1986.
- HERGATY, T.W. The physiology of seed hydration and dehydration and the relation between water stress and the control of germination: A review. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.1, p.101-119, 1978.
- HODGE, J.E.; HOFREITER, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (eds.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, 1962. v.1, p.380-394.
- JOHNSON-FLANAGAN, A.M.; SINGH, J. Membrane deletion during plasmolysis in hardened and non-hardened plant cells. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.9, p.299-305, 1986.
- JULIANO, B.O.; VARNER, J.E. Enzymic degradation of starch granules in the cotyledons of germinating peas. **Plant Physiology**, Rockville, v.44, n. 6, p.886-892, June 1969.
- KARUNAGARAN, D.; RAO, P.R. Mode and control of starch mobilization during germination of seeds of horse gram. **Plant Science**, Ireland, v.73, n. 2, p.155-159, Sept. 1991.
- KOIZUMI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; TSUJI, K.; SHINOZAKI, K. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, Amsterdam, v.129, p.175-182, 1993.
- KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, n. 3, p.829-832, Nov. 1988.
- KRAMER, P.J. **Water relations of plants**. New York: Academic Press, 1983. 489p.
- LEE, C.Y.; SHALLENBERGER, R.S. Changes in free sugar during the germination of pea seeds. **Experientiae**, Viçosa, v.25, n. 5, p.692-693, maio 1979.
- LOVELL, P.H.; MOORE, K.G. A comparative study of cotyledons as assimilatory organs. **Journal of Experimental Botany**, London, v.21, n.69, p.1017-1030, 1970.
- McINTYRE, G.I. The role of water in the regulation of plant development. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, n. 7, p.1287-1298, juil. 1987.
- MACHADO, A.D.; WILLIAMS, W.A.; TUCKER, C.L. Dry matter contribution by cotyledons of lima beans and other epigeal legumes. **Crop Science**, Madison, v.14, n.1, p.90-93, Jan. 1974.

... and ...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...

...  
...  
...



- MARUR, C.J.; SODEK, L.; MAGALHÃES, A.C. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.6, n.2, p.103-108, ago. 1994.
- MAYER, A.M.; SHAIN, Y. Control of seed germination. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.167-193, 1974.
- MELO, G.A. Mobilização de reservas e crescimento inicial da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) durante a propagação vegetativa. Lavras: ESAL, 1994. 49p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- MICHEL, B.E. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology*, Rockville, v.72, n. 1, p. 66-70, May 1983.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v.31, n. 3, p.426-428, Mar. 1959.
- MONERRI, C.; GARCIA-LUIS, A.; GUARDIOLA, J.L. Sugar and starch changes in pea cotyledons during germination. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.67, n. 1, p.49-54, May 1986.
- MURPHY, D.J.; CUMMINS, I.; RYAN, A.J. Immunocytochemical and biochemical study of the biosynthesis and mobilization of the major seed storage proteins of *Brassica napus*. *Plant Physiology*, Rockville, v.27, n. 1, p.647-657, Jan. 1989.
- NG, N.Q.; MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin and germ plasm. In: SINGH, S.R.; RACHIE, K.O. (eds.). *Cowpea research, production and utilization*. Chichester: John Wiley, 1985. p.11-21.
- OLSEN, O.A.; JAKOBSEN, K.S.; SCHMELZER, E. Development of barley aulerone cells: temporal and spatial patterns of accumulation of cell-specific mRNAs. *Planta*, New York, v.181, p.462-466, 1990.
- PALTA, J.P.; PH, L. Alterations in transport properties by freezing injury in herbaceous plants: evidence against rupture theory. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.50, p.169-175, 1980.
- PRISCO, J.T. Effect of salinity on seed germination and seedling establishment. *Tagungsband Deutsche Botanische Gesellschaft Vereinigung für Angewandte Botanik*, Gießen Bundesrepublik Deutschland, 1988. p.30. (Abst.).
- PRISCO, J.T.; AINOUIZ, I.L.; MELO, S.C. Changes in nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.33, p.18-21, 1975.

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

- PRISCO, J.T.; ENEAS FILHO, J.; GOMES FILHO, E. Effect of NaCl salinity on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L.) Walp seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.4, n. 2, p.63-71, dez. 1981.
- PRISCO, J.T.; O'LEARY, J.W. Effect of salt and water stresses on protein synthesizing capacity of embryos-axis of germinating *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.30, n.2, p.317-321, jul. 1970.
- PRISCO, J.T.; VIEIRA, G.H.F. Effects of NaCl salinity on nitrogenous compounds and proteases during germination of *Vigna sinensis* seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.36, n. 4, p.317-320, Apr. 1976.
- PRITCHARD, J.; TOMOS, A.D.; JONES, R.G.W. Control of wheat root elongation growth. **Journal of Experimental Botany**, London, v.38, n. 191, p.948-959, June 1987.
- RAGGI, V. Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water-stressed bean. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n. 3, p.427-434, July 1994.
- RAJASEKHAR, V.K.; GOWRI, G.; CAMPBELL, W.H. Phytochrome-mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, n. 2, p.242-244, Oct. 1988.
- RAJASEKHAR, V.K.; MOHR, H. Appearance of nitrite reductase in cotyledons of the mustard (*Sinapis alba* L.) seedling as affected by nitrate, phytochrome and photooxidative damage of plastids. **Planta**, New York, v.168, n. 3, p.369-376, Aug. 1986.
- RASTOGI, V.; OAKS, A. Hydrolysis of storage proteins in barley endosperms. **Plant Physiology**, Rockville, v.81, n. 3, p.901-906, July 1986.
- RERIE, W.G.; WHITECROSS, M.; HIGGINS, T.J.V. Developmental and environmental regulation of pea legumin genes in transgenic tobacco. **Molecular and General Genetics**, New York, v.225, p.148-157, 1991.
- ROSENBERG, L.A.; RINNE, R.W. Change in seed constituents during germination and seedling growth of precociously matured soybean seeds (*Glycine max* L. Merril). **Annals of Botany**, London, v.60, n.6, p.705-712, Dec. 1987.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4ed. Belmont: Wadsworth, 1992. 682p.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Dehydration injury in germinating soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.72, n. 3, p.620-624, July 1983.
- SINGH, S.R.; RACHIE, K.O. (eds.). **Cowpea research, production and utilization**. Chichester: John Wiley, 1985. 373p.
- SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. **The Plant Cell**, Rockville, v.2, n. 6, p.503-512, June 1990.



- SMITH, D.L. Cotyledon anatomy in the Leguminosae. **Botanical Journal of the Linnean Society of London**, London, v.86, p.325-355, 1983.
- SZE, H.; ASHTON, F.M. Depeptidase development in cotyledons of *Cucurbita maxima* during germination. **Phytochemistry**, Elmsford, v.10, n. 12, p.2935-2942, Dec. 1971.
- TEIXEIRA, S.M.; MAY, P.H.; SANTANA, A.C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (orgs.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. cap. 4, p. 101-136.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood city: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. 559p.
- VAN DER WILDEN, W.; CHRISPPEELS, M.J. Characterization of the isozymes of  $\alpha$  mannosidase located in the cell wall, protein bodies and endoplasmatic reticulum of *Phaseolus vulgaris* cotyledons. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, n. 1, p.82-81, Jan. 1983.
- VAN DER WILDEN, W.; HERMAN, E.J.; CHRISPPEELS, M.J. Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. **Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America**, Washington, v.77, p.428-432, 1980.
- VEERANJANEYULU, K.; KUMARI, B.D.R. Proline metabolism during water stress in mulberry. **Journal of Experimental Botany**, London, v.40, n.214, p.581-583, May 1989.
- VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-272.
- VOLGER, H.; HEBER, U.; BERZBORN, R.J. Loss of function of biomembranes and solubilization of membrane proteins during freezing. **Biochemistry and Biophysics Acta**, New York, v.511, p.455-469, 1978.
- WIEST, S.C.; STEPONKUS, P.L. Freeze-thaw injury to isolated spinach protoplasts and its simulation at above freezing temperatures. **Plant Physiology**, Rockville, v.62, n. 5, p.699-705, Nov. 1978.
- WU, Y.; SPOLLEN, W.G.; SHARP, R.E.; HETHERINGTON, P.R.; FRY, S.C. Root growth maintenance at low water potentials: increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v.106, n. 2, p.607-615, Oct. 1994.
- WYNN, E.K.; MURRAY, D.R. Aminopeptidases isolated from cotyledons of cowpea, *Vigna unguiculata*. **Annals of Botany**, London, v.56, n.1, p.55-60, July 1985.

DEPARTMENT OF  
BIOLOGY  
UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
SAN DIEGO

POST BOX 108  
SAN DIEGO, CALIF.

1961

ALL INFORMATION CONTAINED  
HEREIN IS UNCLASSIFIED  
DATE 08-14-2010 BY 60322 UCBAW/STP

THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY  
100 UNIVERSITY AVENUE  
SAN DIEGO, CALIF. 92106

YOR  
1961

THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY  
100 UNIVERSITY AVENUE  
SAN DIEGO, CALIF. 92106

YOR

THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY  
100 UNIVERSITY AVENUE  
SAN DIEGO, CALIF. 92106

THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY  
100 UNIVERSITY AVENUE  
SAN DIEGO, CALIF. 92106

- XAVIER-FILHO, J. Estudos bioquímicos desenvolvidos com caupi. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (orgs.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. cap.23, p.679-693.
- XU, N.; BEWLEY, J.D. Embryos of alfafa (*Medicago sativa* L.) can synthesize storage proteins after the completion of germination, in response to abscisic acid and osmoticum, if maturation drying is prevented. **Planta**, New York, v.196, n. 3, p.469-476, June 1995.
- YOMO, H.; SRINIVASAN, K. Protein breakdown and formation of protease in attached and detached cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L.. **Plant Physiology**, Rockville, v.52, n. 6, p.671-673, Dec. 1973.
- YOMO, H.; VARNER, J.E. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. **Plant Physiology**, Rockville, v.51, n. 4, p.708-713, Apr. 1973.
- ZIEGLER, P. Carbohydrate degradation during germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.447-474.